

THÈSE

présentée à la Faculté de Pharmacie
de l'Université de Paris

pour l'obtention du titre de Docteur de l'Université de Paris
(mention pharmacie)

par **Pierre RINJARD**
pharmacien

SUR LE DÉPISTAGE DU TRAITEMENT DES VOLAILLES PAR LES ŒSTROGÈNES

soutenue le 16 juin 1964 devant la commission d'examen

Jury de Thèse :

M. A. QUEVAUVILLER, président

M. R. TRUHAUT, professeur

M. G. LE MOAN, Maître de Conférences

THÈSE

présentée à la Faculté de Pharmacie
de l'Université de Paris

pour l'obtention du titre de Docteur de l'Université de Paris
(mention pharmacie)

par **Pierre RINJARD**
pharmacien

SUR LE DÉPISTAGE DU TRAITEMENT DES VOLAILLES PAR LES ŒSTROGÈNES

soutenue le 12 juin 1964 devant la commission d'examen

Jury de Thèse :

M. A. QUEVAUVILLER, président
M. R. TRUHAUT, professeur
M. G. LE MOAN, Maître de Conférences

PERSONNEL DE LA FACULTE DE PHARMACIE DE PARIS

Administration

M. G. VALETTE O. *, C. *	Doyen.
M. M.M. JANOT, O. *, C. *	Assesseur.
M. P. MALANGEAU, O. *	Assesseur.
M. L. RODINEAU, *, O. *	Secrétaire général.
Mme S. FERRARI, O. *	Attachée principale.
M. L. JEANDEL, O. *	Attaché.
Mme C. PEILLON	Attachée.
Mlle G. BIDEAU	Secrétaire.
Mme S. CERTAIN, O. *	Secrétaire.
Mme M. COUSIN	Secrétaire.
M. A. DROUILLY, O. *	Secrétaire.
Mme M.L. ESPINASSE, O. *	Secrétaire.
Mlle A.M. FAVERJON	Secrétaire.
M. G. FROISSART, O. *	Secrétaire.
Mme L. WARNESSON, *	Secrétaire.

Doyen Honoraire

M. R. FABRE, C. *, C. *	Membre de l'Institut.
-------------------------	-----------------------

Professeurs Honoraires

M. M. DELEPINE, C. *, C. *	Membre de l'Institut.
M. L. LAUNOY, O. *, O. *	
M. P. FLEURY, O. *, C. *	
M. M. MASCRE, O. *, C. *	
M. M. PICON, O. *, O. *	
M. C. BEDEL, *, O. *	
M. R. FABRE, C. *, C. *	Membre de l'Institut.



Professeurs

M. M.M. JANOT, O. *, C. *	Pharmacie galénique (T).
M. G. VALETTE, O. *, C. *	Pharmacodynamie (T).
M. R. PARIS, *, O. *	Histoire naturelle des médicaments simples d'origine végétale (T).
M. M. GUILLOT, *, O. *	Physique (T).
M. J.A. GAUTIER, *, O. *	Chimie organique (T).
Mlle S. LAMBIN, *, O. *	Microbiologie (T).
M. Y. RAOUL, *, O. *	Physiologie (T).
M. J. COURTOIS, *, O. *	Chimie biologique (T).
M. L. DOMANGE, *, O. *	Chimie minérale (T).
M. P. CRETE, *, O. *	Botanique (T).
M. R. TRUHAUT, O. *, O. *	Toxicologie et Hygiène industrielle (T).
M. A. MORETTE, *, O. *	Hydrologie (T).
M. R. CAVIER, O. *	Parasitologie (T).
M. A. QUEVAUVILLER, *, O. *	Hygiène et Education sanitaire (T).
M. R. MOREAU, *, O. *	Pharmacie chimique (T).
M. J. GUY, O. *	Mathématiques appliquées aux Sciences physiques et biologiques (T).
M. A. GERMAN, O. *	Virologie et Sérologie (T).
M. M. PIETTE, *, O. *	Biologie sanguine (T).
M. P. MALANGEAU, O. *	Chimie analytique (T).
M. M. GIRARD, O. *	Chimie appliquée à l'expertise (T).
M. G. DILLEMANN	Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie (T).
M. G. DEYSSON, O. *	Cytologie végétale (T).
M. J. FLAHAUT, *	Minéralogie (T).

M. A. LE HIR.....	Pharmacie galénique.
M. J. RENAULT, O.....	Chimie organique.
M. C. BOUDENE.....	Toxicologie et Hygiène industrielle (T).
M. P. LARUELLE.....	Physique.
M. P. ROSSIGNOL.....	Pharmacodynamie.
M. A. MANGEOT, O. O.....	Pharmacie galénique industrielle.
M. P. DELAVEAU.....	Matière médicale.

Maîtres de Conférences

M. R. BOURDON.....	Chimie analytique.
M. Y. COHEN.....	Sciences naturelles.
M. G. LE MOAN.....	Sciences appliquées.
M. H. RENAULT, O. O.....	Pharmacie chimique.
M. C. PAOLETTI.....	Sciences appliquées.
M. P. REYNAUD.....	Sciences physico-chimiques.
M. J. POISSON.....	Sciences naturelles.
M. A. DESVIGNES, O.....	Cryptogamie et technique bactériologique.
M. F. PERCHERON.....	Sciences appliquées.
M. J. SAVEL.....	Biologie animale.
M. J. BORY.....	Sciences naturelles.

Chefs de Travaux Pratiques

M. P. BINET.....	Parasitologie.
M. A. CARLIER (F.F.).....	Pharmacie galénique industrielle.
M. A. CAVE.....	Pharmacotechnie.
M. P. CORRIEZ, O. O.....	Physique.
M. C. DREUX (F.F.).....	Electrochimie appliquée à l'analyse.
M. P. GESTEAU, *, O. O.....	Physique biologique.
M. J.C. GOUNELLE.....	Analyse appliquée au contrôle des médicaments (Section Biologie).
M. H. GUERIN, *, O. O.....	Micrographie (3 ^e année). Essais des drogues végétales.
M. J. HARISPE, O. O.....	Chimie générale et pharmaceutique.
M. J. HENRY.....	Chimie (4 ^e année).
Mme J. HUBERT.....	Microbiologie.
Mlle Y. JUND (F.F.).....	Microbiologie.
Mme N. LEGER (F.F.).....	Parasitologie.
M. R. LELUC.....	Microbiologie.
M. A. LEMONNIER.....	Chimie analytique (2 ^e et 3 ^e année).
Mlle M. LOISEAU (F.F.).....	Chimie (4 ^e année).
Mlle S. LONGUEVALLE, O. O.....	Service des examens de chimie.
M. J. MANDEREAU (F.F.)...	Pharmacotechnie.
Mlle H. MORIN, O. O.....	Pharmacodynamie.
M. NGUYEN PHU LICH (FF)	Toxicologie.
M. F. PELLERIN.....	Chimie analytique (2 ^e et 3 ^e année).
M. R. PERLES.....	Chimie biologique.
M. P. POUILLAIN.....	Hématologie.
Mme M. ROBERT.....	Sérologie.
Mlle A. ROLLEN, *, O. O..	Biologie végétale.
Mme N. SALES (F.F.).....	Biologie animale.
Mlle L. SEGUIN (F.F.) O. O..	Analyse appliquée au contrôle des médicaments (Section Physico-Chimie).
Mme M. SEILLER (F.F.)....	Pharmacie galénique industrielle.
M. J. YONGER (F.F.).....	Chimie analytique (1 ^{re} année).

Bibliothèque

Mlle Y. RUYSEN, *, O. O..	Conservateur, chargée de la Direction.
Mlle S. LAVAUD, *, O. O...	Conservateur.
Mme G. KREHMER, O. O...	Conservateur.
Mme A. DESGRIPPES, O. O...	Bibliothécaire.

A LA MEMOIRE DE MON PERE

A MA MERE

A MA FEMME

A MON FRERE

le Docteur Vétérinaire Jean RINJARD
Sous-Directeur au Muséum National d'Histoire Naturelle

En témoignage de profonde affection.

A M. le Professeur A. QUEVAUVILLER
Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris

A M. le Professeur R. TRUHAUT
Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris

A M. le Professeur G. LE MOAN
Maître de Conférences à la Faculté de Pharmacie de Paris

TABLE DES MATIÈRES

Introduction	15
A — Généralités	15
B — Position du problème	16
C — Inconvénients éventuels pour la santé publique	17
D — Historique	18
E — Plan de l'exposé	21
Recherches personnelles	23
Première Partie : Mise au point de la technique	25
I. — Principe	25
II. — Recherches préliminaires	26
1. Choix du matériel utilisé	26
2. Choix du nombre optimal des lots de souris	26
3. Addition d'œstrogènes	27
4. Recherche du milieu de conservation des utérus prélevés ...	27
5. Mise au point de l'aliment	32
6. Evolution du poids de l'utérus en fonction du temps	42
7. Histologie	43
Conclusion : technique adoptée	45
III. — Mise au point avec les œstrogènes de synthèse — Influence de la durée du traitement et de la dose d'œstrogène	45
A — Recherches liminaires	45
B — Recherche d'une méthode simplifiée avec la viande de volaille	52
C — Recherche de précocité	54
IV. — Mise au point avec les œstrogènes naturels	58
1. Introduction	58
2. Technique	59
3. Conclusion	61
V. — Conclusion : essai quantitatif	62
A — Généralités	62
B — Graphique	62
C — Discussion	63
D — Conclusion	64

Deuxième Partie : Conséquences de la castration chimique	65
A — Par insertion de comprimés dans le derme des volailles	66
1. Comprimés d'œstrogènes synthétiques	66
— Réception des animaux	66
— Réalisation des essais	67
— Observation clinique	67
— Constatations nécropsiques	67
— Etude histologique	67
— Poids des poulets témoins et traités	67
2. Comprimés d'œstrogènes naturels	69
— Réception des animaux	69
— Réalisation des essais	69
— Observation clinique	69
— Constataction nécropsique	70
— Poids des poulets témoins et traités	70
B — Par addition d'œstrogènes dans les aliments	71
1. Œstrogènes synthétiques	71
2. Œstrogènes naturels	82
C — Conclusion	85
Troisième Partie : Recherche des œstrogènes dans les carcasses	87
A — Poulets traités par insertion de comprimés dans le derme ..	87
1. Comprimés d'œstrogènes synthétiques	87
1) Le foie	87
2) Le cou	89
3) La viande	90
Conclusion	92
2. Comprimés d'œstrogènes naturels	92
1) Le foie	92
2) Le cou	93
3) La viande	94
Conclusion	96
B — Poulets traités par addition d'œstrogènes dans les aliments ..	96
1. Œstrogènes synthétiques	96
2. Œstrogènes naturels	110
Quatrième Partie : Application de la méthode à une expertise	113
1. Prélèvement	113
2. Etude systématique des prélèvements	114
Conclusion	116
Conclusions générales	117
Bibliographie	121

Avant d'admettre une chose, en Sciences, il convient d'avoir cherché à se la prouver fausse par tous les moyens.

P. TEILHARD DE CHARDIN.

INTRODUCTION

A. — GÉNÉRALITÉS

Dans les grandes villes principalement, la population s'inquiète de plus en plus de la qualité des produits qu'elle consomme. Cette inquiétude est d'ailleurs largement entretenue par les journaux « à grand tirage » qui titrent : « Nos aliments sont-ils dangereux pour notre santé? »; et on parle avec nostalgie des produits naturels et principalement des poulets nourris seulement de grains, d'autant plus que la consommation du poulet augmente sans cesse, en raison de son prix de revient peu élevé, par rapport aux viandes dites de boucherie. Pour accroître l'offre autant que la demande, on a administré des œstrogènes à des poussins mâles ou à des coquelets afin d'obtenir des « chapons artificiels ». En effet, il était connu des éleveurs que l'ablation des testicules, quand elle est réalisée chez le poulet à l'âge de six ou sept semaines, avait pour effet non seulement de prévenir la sexualisation de l'oiseau, mais encore de le faire engraisser en rendant sa chair plus tendre par diminution du tissu conjonctif. Mais les éleveurs tendaient à substituer au « chaponnage chirurgical », qui est d'une exécution délicate et non rentable au point de vue économique, le « chaponnage chimique » qui est une opération beaucoup plus rapide. Ce moyen s'était largement développé aux Etats-Unis, et avait été introduit en France dans les grands élevages de volailles. Cette pratique susceptible d'avoir des répercussions sur la santé des consommateurs a été interdite par le décret n° 59-450 du 20 mars 1959 qui supprime en France la vente d'aliments pour animaux additionnés de substances œstrogènes. L'administration directe des mêmes substances à des animaux destinés à la consommation humaine est également interdite.

Voici le texte du décret paru au J.O. du 24 mars 1959 :

ARTICLE PREMIER. — « Le ministre de l'Agriculture et le ministre de la Santé publique et de la Population peuvent, par arrêté concerté, interdire la détention en vue de la vente, la mise en vente ou la vente d'aliments additionnés de certaines substances chimiques ou biologiques et destinés à des animaux dont la chair ou les produits sont consommés par l'homme. Sont d'ores et déjà interdites la détention en vue de la vente, la mise en vente ou la vente d'aliments additionnés de substances arsenicales, antimoniales ou œstrogènes. »

ARTICLE 2. — « Sont interdites la détention en vue de la vente, la mise en vente ou la vente, pour la consommation humaine, des animaux ou des denrées alimentaires en provenance d'animaux auxquels ont été administrées, *par quelque procédé que ce soit*, des substances arsenicales, antimoniales ou œstrogènes ».

Dans cette étude, nous traiterons uniquement du problème des substances œstrogènes.

B. — POSITION DU PROBLÈME

Cette réglementation française est comparable à la réglementation qui existe dans d'autres pays. Le décret n° 62-827 du 21 juillet 1962 (J.O. du 22 juillet 1962) régit l'importation de certains produits avicoles : « Il est interdit, sous tous régimes douaniers autres que le transit, d'importer des produits avicoles originaires ou en provenance de pays dans lesquels l'emploi des substances arsenicales, antimoniales ou œstrogènes n'est pas prohibé pour l'alimentation et l'élevage des volailles ». Par arrêté du 20 septembre 1962 (J.O. du 2 octobre 1962) la liste des pays ayant interdit l'emploi des substances visées à l'article premier du décret n° 62-827 du 21 juillet 1962 s'établit comme suit à la date du présent arrêté : « Belgique, Israël, Italie, Pays-Bas, République Fédérale d'Allemagne, Suisse ».

La « Food and Drug Administration » a admis en 1947 aux Etats-Unis l'emploi de diéthylstilbœstrol chez les volailles en fin d'engraissement. La substance est appliquée par voie sous-cutanée à la crête des poulets de six à huit semaines à la dose de 12 à 15 mg. L'utilisation d'implant de diéthylstilbœstrol chez les poulets de chair ne dépasse pas 1 p. 100 de la production, et depuis décembre 1959, par suite d'un accord conclu entre le ministère de la Santé et l'Industrie, elle n'est plus officiellement en usage aux Etats-Unis.

Il s'agit donc d'une question fort importante pour l'hygiéniste et un contrôle rigoureux s'impose de l'absence de ces substances et dans les viandes (notamment des volailles) et dans les aliments des animaux.

Le problème se pose en ce qui concerne :

— d'une part, les œstrogènes synthétiques ou naturels administrés dans la nourriture des animaux,

— d'autre part, les pellets insérés dans le derme, notamment chez les volailles (« castration » chimique).

Il s'agit donc de trouver une méthode pratique de détection des œstrogènes dans les carcasses.

C. — INCONVÉNIENTS ÉVENTUELS POUR LA SANTÉ PUBLIQUE

De nombreux travaux ont été consacrés aux œstrogènes végétaux : Ferrando, Boisselot-Lefebvres, Ratsimamanga (8) ont montré que le lait donné à de jeunes rats, pris au sevrage, a un effet très net sur la croissance. Cet effet de croissance s'accompagne de modifications pondérales de certains organes, notamment des glandes à sécrétion interne. L'abaissement du poids des testicules chez le mâle, l'augmentation du poids des ovaires chez la femelle indiquent une réaction de type hormonal à prédominance œstrogène inhibant la fonction mâle. Coussens et Sierens (6) rapportent à la consommation de bulbes de tulipes, l'apparition chez la femme de troubles de la reproduction. A. Quevauviller et P. Binet (28) envisagent le risque d'absorption d'œstrogènes pour l'homme qui consomme la viande ou le lait d'animaux traités soit par implantation d'hexœstrol ou de stilbœstrol, soit par addition d'œstrogènes aux aliments eux-mêmes. La présence d'œstrogènes naturels dans les aliments, loin d'excuser l'addition d'œstrogènes synthétiques, la condamne au contraire. Il convient, en effet, de ne pas ingérer une quantité trop importante d'œstrogènes, et pour cela, leur addition aux aliments des animaux, ainsi que les implants semblent contraires à l'hygiène alimentaire. Lorsque les animaux sont soumis à une alimentation en hormones ou lorsqu'ils sont traités par les hormones, il se produit une accumulation de ces dernières dans le tissu adipeux. Il s'ensuit que la consommation de la viande et de la graisse des animaux dont la croissance a été accélérée par l'administration d'œstrogènes, peut constituer un danger qui est loin d'être négligeable. Des accidents sont ainsi survenus à la suite d'ingestion trop importante de viande de poulets. Des cuisiniers, qui ont consommé en grand nombre

des cous de poulets non servis à la clientèle, ont présenté des symptômes de « féminisation »; avec arrêt du développement de la barbe. De même des accidents ont été signalés dans une famille se nourrissant de poulets trois fois par semaine : hyperfolliculinémie chez les femmes, avec des périodes menstruelles rapprochées; apparition des règles chez une fillette de cinq ans. Il est donc nettement nocif d'ajouter des œstrogènes dans l'alimentation, et il est tout à fait normal que le décret de 1959 en interdise l'emploi dans l'élevage.

D. — HISTORIQUE

Le problème de la présence d'hormones dans les aliments a été posé de façon précise par A.-R. Ratsimamanga et J. Boisselot-Lefebvres (29). Pour ces auteurs, il est nécessaire de faire l'analyse des aliments d'origine animale ou végétale en étudiant systématiquement leur teneur en substance hormonale. Toute cause capable de modifier l'équilibre endocrinien, par défaut ou par excès d'hormone, peut avoir un retentissement sur la nutrition de l'organisme. Certains éleveurs administrent des hormones œstrogènes aux porcs, aux moutons, aux volailles. Ce traitement a pour résultat de hâter la croissance et l'engraissement. On pourrait croire que ce traitement influence favorablement l'utilisation des aliments. Les recherches actuelles démontrent que tout apport extérieur de substances hormonales non seulement modifie profondément le métabolisme interne de la cellule en général, mais aussi porte ses effets sur le fonctionnement des glandes à sécrétion interne. L'administration d'œstrogènes aux animaux correspond à une véritable « castration fonctionnelle », et, si le rendement uniquement pondéral en viande est amélioré, la reproduction, par contre, est compromise.

La plupart des hormones introduites dans l'organisme des animaux sont emmagasinées et dégradées par le foie. Il sera très important de rechercher les résidus œstrogéniques contenus dans le foie, car celui-ci est très utilisé dans les préparations culinaires sous forme de pâté de foie. R. Ferrando et Ratsimamanga (9) posent le problème de savoir si les œstrogènes de synthèse sont inoffensifs ou moins actifs que les œstrogènes naturels.

Les restes œstrogéniques peuvent-ils être cancérogènes?

Aux Etats-Unis, on a envisagé un nouvel aspect de la question avec la loi « Delaney ». C'est un complément aux « U.S.A. Food Additive Amendment » qui dit qu'aucune substance considérée

cancérogène ne doit trouver d'application chez l'Homme et l'animal. La question de la cancérogenèse est très controversée.

Des recherches effectuées par Laccassagne (20), Butenandt (5), Bern (3) n'attribuent aux œstrogènes aucune action déterminante dans l'évolution des carcinomes mammaires, mais simplement favorisante. Cette opinion n'est pas partagée par tous les cancérologues : certains auteurs comme Abramson et Warshawsky, Scarff et Smith, Fitzsimons in Truhaut (33) ainsi que Hertz (15) soulignent qu'en plus de leur action hormonale, les œstrogènes synthétiques peuvent être cancérogènes. Mais il est établi avec certitude que les œstrogènes ne peuvent être classés avec les concérogènes habituels connus, de sorte qu'ils prennent une place à part. D'après Muehlbock (27), ils sont sans action spécifique et ne sont cancérogènes que pour des races de souris particulièrement sensibles aux tumeurs mammaires.

Lorenz (24), Andrews et coll. (1) ont démontré que les implantations de comprimés de stilboestrol augmentent le poids, l'adiposité et améliorent la qualité de la carcasse. Letard, Szumowski et Thérêt (22) ont constaté que l'augmentation de l'adiposité était due à une lipémie marquée. Le traitement par les œstrogènes a augmenté aussi l'efficacité de la conversion de l'énergie alimentaire en calories de carcasses consommables dans une proportion de 75 p. 100 chez le poulet. Le mécanisme d'action des œstrogènes sur la croissance et l'engraissement des animaux est en général peu connu.

Koch (18) suppose que le phénomène d'accélération de l'engraissement chez les animaux par les hautes doses d'œstrogènes est comparable à l'action des hautes concentrations d'œstrogènes naturels contenus dans le sang des femelles vers la fin de la gestation. Il considère que l'accumulation de glycogène et de sucre est provoquée par les hautes doses d'œstrogènes, qu'elle a une influence sur le métabolisme des glucides et des lipides et favorise la transformation des glucides en graisses corporelles.

Griffith et coll. (12) ont observé que chez les rats traités par les œstrogènes, il y avait une accumulation de glycogène dans le foie, dans les muscles avec légère hyperglycémie.

D'autres auteurs, comme Entemann et coll. (7), Lorenz et coll. (25), Hertz et coll. (15), Stamler et coll. (31) ont trouvé que les fortes doses d'œstrogènes implantées provoquent un engraissement intensif chez les volailles et les rats; ceux-ci montrent une haute concentration de graisse, de phospholipides, riboflavine et cholestérol dans le sang, ainsi qu'un abaissement du taux normal d'hémoglobine [Wolterink (35)].

Les œstrogènes ont une réaction inhibitrice sur la sécrétion des hormones thyroïdiennes de l'hypophyse [Loeser et Marx (23)],

ce qui a pour conséquence une action indirecte sur l'activité thyroïdienne, d'où abaissement des métabolismes et tendance à l'adiposité [Letard et Szumowski (21)]. C'est par ce mécanisme que Schaper (30) explique l'engraissement des mâles castrés soumis au traitement des œstrogènes de synthèse.

D'après Koch et Heim (19), les œstrogènes se fixent en notable proportion sur le tissu adipeux, et par suite, les graisses provenant des animaux traités seront anormalement riches en œstrogènes. Pour Bird, Prigsley et Kletz (4) l'activité œstrogénique est retrouvée dans tous les tissus des jeunes coqs traités par les œstrogènes synthétiques. Les auteurs signalent principalement le foie, la peau et le tissu adipeux. Ils étudient l'activité œstrogénique uniquement sur le tissu adipeux.

Gassner et coll. (10-11) ont expérimenté sur des oiseaux et des bovins avec du diéthylstilbœstrol : les concentrations d'œstrogènes les plus hautes dans le corps des animaux, à part le lieu d'implantation, se trouvent dans le foie et la bile. D'après Hopwood (16) le diéthylstilbœstrol est excrété en partie sous une forme biologique inactivée; le sang et la bile semblent être les parties les plus riches en conjugués inactifs biologiquement, ensuite le foie et le contenu intestinal, enfin les fèces et l'urine. Karg H. (17) a essayé de mesurer les propriétés biologiques du diéthylstilbœstrol marqué par le carbone 14. Après incubation avec du foie de poule, le diéthylstilbœstrol est inactivé en grande partie sous forme de composés solubles dans l'eau qui semblent être des glycuronides excrétés dans les premiers jours du traitement.

— Pour la détection des résidus œstrogéniques dans les carcasses des volailles, nous utilisons, comme on le verra plus loin, le test d'Astwood (2) qui consiste en l'augmentation du poids de l'utérus de souris après injection d'œstrogènes.

Avec le test d'Allen et Doisy, fondé sur l'apparition de cellules kératinisées dans le mucus vaginal, on a pu trouver d'après Halama (13) des valeurs de 2,5 mg d'œstrogènes par kilogramme de tissu, cependant il faut pour cela une administration de onze jours durant aux animaux témoins. La durée de cette épreuve la rend impossible à appliquer en cas d'expertise rapide.

— Des recherches antérieures, concernant le dosage des résidus œstrogéniques, ont déjà été entreprises :

Stob, Andrews et Zanrow (32) utilisent comme épreuve l'augmentation du poids de l'utérus de souris, alors que Wiberg et Stephenson (34) emploient uniquement l'augmentation du poids de l'utérus des rates femelles impubères. Les rates sont placées dans des cages par groupe de dix. Les animaux reçoivent six grammes de nourriture par jour. Les animaux (souris femelles

ou rates) sont sacrifiées vingt-quatre heures après avoir reçu le dernier biscuit. Les utérus sont prélevés et pesés.

Herrick, Paulson, Baron et coll. (14) observent que la bile des veaux recevant du diéthylstilbœstrol, présente une action œstrogène : les souris reçoivent par voie sous-cutanée 0,1 cm³ d'extrait de bile pendant quatre jours. Les souris sont sacrifiées quarante-huit heures après la dernière injection et leurs utérus pesés.

Louwerens (26) constate une augmentation du poids de l'utérus de la souris après ingestion de foie provenant de volailles sur lesquelles l'implantation d'œstrogènes a été pratiquée.

— Le temps d'élevage des animaux de laboratoires (souris femelles ou rates) diffère suivant les auteurs. Stob et coll. sacrifient les souris au bout de dix jours de traitement. Wiberg et Stephenson proposent de nourrir les rates pendant une période de huit jours.

E. — PLAN DE L'EXPOSÉ

Nous allons envisager dans une première partie, la mise au point des conditions générales d'études : principe, technique, histologie. Dans une deuxième partie, nous envisagerons les conséquences de la castration chimique chez les jeunes coqs (comprimés insérés sous le derme ou œstrogènes ajoutés aux aliments). La troisième partie sera consacrée au dépistage des résidus œstrogéniques par les méthodes que nous avons mises au point à partir de jeunes poulets que nous avons traités nous-mêmes au laboratoire. Enfin, dans une quatrième partie, nous appliquerons notre méthode à une expertise.

Avant de commencer l'exposé de nos recherches personnelles, nous tenons à évoquer la mémoire de M. le Professeur G. Zundel qui nous a apporté de si précieux encouragements dans nos recherches.

Nous tenons à remercier M. le Professeur Ferrando, Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, et M. le Professeur Vuillaume, successeur de M. le Professeur Zundel, qui ont bien voulu nous accueillir et nous permettre de poursuivre nos recherches à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort.

M. le Professeur Quevauviller s'est intéressé à notre travail, nous a inscrit dans son laboratoire, nous a conseillé dans la présentation de cette thèse et a accepté de présider notre jury. Nous lui adressons l'expression de nos sentiments reconnaissants.

M. le Professeur Truhaut, dont la compétence particulière en ce qui concerne les additifs alimentaires et les substances cancérigènes est mondialement reconnue, a bien voulu, lui aussi, juger se travail. Nous l'en remercions très sincèrement.

M. Le Moan, Maître de Conférences, était particulièrement qualifié en raison de ses fonctions de rédacteur à la société scientifique d'hygiène alimentaire, pour critiquer nos recherches. Qu'il trouve ici, l'expression de toute notre gratitude.

Enfin, nous remercions le personnel du Laboratoire de Chimie et Toxicologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, qui nous a toujours aidé avec le plus grand dévouement.

Recherches personnelles

PREMIÈRE PARTIE

MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE

Après avoir énoncé le principe de notre méthode, nous allons étudier, d'abord, un certain nombre de recherches préliminaires, concernant le choix des animaux, le milieu de conservation des utérus, la mise au point de l'aliment des souris et l'évolution du poids de l'utérus de souris en fonction du temps. Ensuite, nous mettrons au point notre méthode concernant la recherche des œstrogènes naturels et synthétiques en insistant tout particulièrement sur l'influence de la température, de la durée du traitement et de la dose d'œstrogènes.

Enfin, nous terminerons ce chapitre en envisageant un essai quantitatif de notre méthode.

I. — PRINCIPE

Les méthodes chimiques d'extraction et de dosage sont notoirement insuffisantes du point de vue sensibilité, et il faut le dire fidélité et justesse, en particulier aux concentrations étudiées. Seules les méthodes biologiques apportent des moyens d'investigation convenable.

L'animal d'épreuve est le souriceau femelle âgée de 21 jours, qui reçoit le produit suspect dans son alimentation. L'utérus est le réactif biologique : son poids augmente en fonction du temps et en fonction de la dose d'œstrogène fournie.

II. — RECHERCHES PRÉLIMINAIRES

1) Choix du matériel utilisé

a) *Les animaux* : Nous utilisons des souris femelles impubères âgées de vingt-et-un jours qui pèsent, dans la lignée utilisée constamment, environ dix grammes avec un ou rarement deux grammes en plus ou en moins. Ce sont des souris albinos de souche « Swiss », provenant de l'élevage de la « Tête Noire » à Beaumont (Vienne).

b) *Réception des animaux* : A la réception, les souris, une fois pesées, sont placées soit individuellement dans des bocaux de quatorze centimètres de haut et dix centimètres de diamètre avec des copeaux et du coton, soit par groupe de cinq, dix ou quinze dans des cages grillagées classiques. Les souris reçoivent de l'eau par un biberon.

c) *La nourriture* : Elle se compose de viandes de poulets préalablement désossées et passées au hachoir et de farine U.A.R., aliment pour souris composé de :

- Maïs, orge, avoine.
- Lin, arachides, soja cuit.
- Viande, poisson, sang, levure.
- Concentré minéral.

Maximum :

Matières cellulosiques : 6 p. 100.

Matières minérales : 10 p. 100.

Minimum :

Protéines brutes : 17 p. 100.

Matières grasses : 4 p. 100.

2) Choix du nombre optimal des lots de souris

En général, nous employons des lots de trente ou quarante, rarement cinquante souris. La moitié, environ, de ces lots est utilisée comme témoins. Nous estimons que quinze, vingt ou vingt-cinq souris suivant les cas sont suffisantes pour démontrer l'existence ou l'absence d'œstrogènes dans les carcasses.

3) Addition d'œstrogène

Lors de la préparation des biscuits, nous ajoutons suivant les cas, soit des œstrogènes de synthèse comprenant un mélange à parties égales de stilbœstrol et hexanœstrol, que l'on trouve dans le commerce pour cet usage, soit des œstrogènes naturels (œstradiol). Le dosage est toujours exprimé en microgrammes par kilogramme de viande.

Nos premières expériences ont permis de montrer que 40 microgrammes d'œstrogènes par kilogramme représentent une moyenne qui donne des résultats nets et précis. Cette quantité d'œstrogènes servira de base à toutes nos expériences préliminaires.

4) Recherche du milieu de conservation des utérus prélevés

L'utérus étant prélevé, le moyen idéal serait la pesée immédiate; mais, par suite du nombre d'opérations à effectuer, il a paru préférable de rechercher un milieu de conservation, qui empêche les utérus de se déshydrater; nous avons ensuite mis au point l'alimentation des souris, de façon à déterminer une technique de base.

Nous avons utilisé l'eau distillée et le soluté physiologique à 9 p. 1 000 et nous avons recherché quel est celui des deux liquides qui permet la conservation de l'utérus, sans augmentation ou diminution notable du poids par rapport à son poids sec immédiat.

Lot de souris N° 2

a) *Technique*

Les souris sont placées par groupe de dix; toutes les souris reçoivent la même nourriture, à savoir trois parties de viande de poulet, plus une partie de farine servant de liant.

Les souris sont sacrifiées le deuxième, troisième, quatrième et cinquième jour. A chaque fois, nous pesons l'utérus dès que la dissection a été effectuée. Une partie des utérus est ensuite placée dans l'eau distillée, l'autre partie placée dans le soluté physiologique à 9 p. 1 000. Quinze minutes après, les utérus sont retirés, séchés sur papier filtre et pesés.

b) *Résultats :*

DEUXIÈME JOUR

Premier groupe :

Tableau I

Numéro de la souris	Poids immédiat sec en mg	Poids après passage eau dist. (15 minutes)	Différence
1	7	11	+ 4
2	8	12	+ 4
3	8	12	+ 4
4	12	16	+ 4
Moyenne poids utérus < à sec			8,7
			eau distillée 12,7

Ecart : 4 mg

Deuxième groupe :

Tableau II

Poids immédiat sec en mg	Poids après passage physiologique (15 minutes)	Différence
7	7	0
8	9	+ 1
12	12	0
12	13	+ 1
08	08	0
9	9	0
Moyenne poids utérus < à sec		9,3 mg
		soluté physiologique 9,6 mg

Ecart : 0,3 mg

TROISIÈME JOUR

Premier groupe :

Tableau III

Poids immédiat sec en mg	Poids après passage eau distillée (15 minutes)	Différence
15	22	+ 7
12	18	+ 6
12	17	+ 5
12	17	+ 5
11	14	+ 3
Moyenne poids utérus < à sec		12,4
		eau distillée 17,6

Ecart : 5,2 mg

Deuxième groupe :

Tableau IV

Poids immédiat sec en mg	Poids après passage soluté physiologique (15 minutes)	Différence
12	13	+ 1
10	11	+ 1
13	13	0
8	8	0
11	12	+ 1
Moyenne poids utérus < à sec		10,8
		soluté physiologique .. 11,4

Ecart : 0,6 mg

QUATRIÈME JOUR

Premier groupe :

Tableau V

Poids immédiat sec en mg	Poids après passage eau distillée (15 minutes)	Différence
17	22	+ 5
15	19	+ 4
12	15	+ 3
16	21	+ 5
09	12	+ 3
Moyenne poids utérus < à sec		13,8
		eau distillée 17,8

Ecart : 4,0 mg

Deuxième groupe :

Tableau VI

Poids immédiat sec en mg	Poids après passage soluté physiologique (15 minutes)	Différence
15	15	0
12	13	+ 1
17	17	0
11	11	0
09	09	0
Moyenne poids utérus < à sec		12,8
		soluté physiologique .. 13,0

Ecart : 0,2 mg

CINQUIÈME JOUR

Premier groupe :

Tableau VII

Poids immédiat sec en mg	Poids après passage eau distillée (15 minutes)	Différence
17	21	+ 4
14	17	+ 3
12	15	+ 3
17	20	+ 3
12	15	+ 3
Moyenne poids utérus < à sec		14,4
		eau distillée 17,6

Ecart : 3,2 mg

Deuxième groupe :

Tableau VIII

Poids immédiat sec en mg	Poids après passage soluté physiologique (15 minutes)	Différence
18	18	0
19	19	0
12	12	0
14	15	+ 1
14	14	0
Moyenne poids utérus < à sec		15,4
		soluté physiologique .. 15,6

Ecart : 0,2 mg

c) Conclusion :

1) Pour l'eau distillée :

L'utérus isolé en absorbe une certaine quantité que le papier filtre ne peut plus assécher, ce qui donne un écart de poids s'étendant de 3,2 mg à 5 mg par rapport au poids sec.

Cet essai suffit à démontrer que l'emploi d'eau distillée ne convient pas dans ce cas particulier.

2) Pour le soluté physiologique :

Les résultats sont satisfaisants, l'écart de poids allant de 0,2 mg à 0,6 mg, ce qui reste négligeable pour nos essais.

Nous utiliserons donc, au cours des recherches qui vont suivre, le soluté physiologique pour maintenir l'état d'hydratation des pièces opératoires.

5) Mise au point de l'aliment des souris

A. — Généralités

a) Recherche d'un régime satisfaisant :

La viande de poulets est passée plusieurs fois au hachoir afin d'obtenir un hachis homogène. Nous pouvons facilement préparer des boulettes de viande, mais lors du passage à l'étuve, nous avons remarqué des « craquelures » dans les boulettes, ce qui les rendait impropres à la consommation des souris qui en gaspillaient la majeure partie. Il était nécessaire d'ajouter à la viande de poulets une certaine quantité de farine U.A.R., servant de liant; nous avons ainsi étudié la fabrication de deux sortes de biscuits.

— *Premier régime* : Trois parties de viande de poulets additionnées d'une partie de farine : cette méthode est rapide, car elle permet d'obtenir une « boulette » de viande de bonne consistance que l'on peut fractionner facilement en petite « boulette » de neuf grammes.

— *Deuxième régime* : Parties égales de viande de poulets et farine; cette méthode est plus longue car il faut ajouter 40 cm³ d'eau environ pour obtenir une boulette de bonne consistance.

b) Séchage :

Il y a deux méthodes possibles :

1. — Séchage à l'air libre : Les boulettes de viande sont données crues aux souris; celles-ci en sont friandes, mais il y a gaspillage important par suite de l'émiettement de la boulette.

2. — Séchage à l'étuve à 100° : Les poulets étant toujours consommés cuits, il était préférable de vérifier si les œstrogènes étaient détruits ou non par la chaleur. A la suite de ce passage à l'étuve, nous obtenons des biscuits secs, pesant environ 7 grammes, qui sont bien acceptés par les souris.

3. — Résultats : Lot n° 6 : Le groupe A comprend 10 souris

qui reçoivent quotidiennement un biscuit séché pesant 7 g. Le groupe B comprend 10 souris qui reçoivent par jour une boulette crue pesant environ 9,5 g.

Viande de poulet .. 3 parties

Farine 1 partie + 40 µg d'œstrogène synthétique par kilogramme.

Poids des utérus de souris au huitième jour (souris âgée de 29 jours) :

Tableau IX

Groupe A	Groupe B
45	61
40	48
51	39
48	49
33	34
41	46
50	50
54	58
72	42
60	54
Moyenne : 49,4	48,1

Les résultats sont très voisins avec les biscuits séchés ou non; mais pour des raisons de commodité (vérification de l'absorption quotidienne de la nourriture donnée) dans tous nos essais, nous donnerons aux souris des boulettes toujours séchées.

c) Régime quotidien des souris :

Cette étude nous a permis de connaître le poids utile de biscuits à fournir quotidiennement aux souris.

1. — Technique :

Le lot de souris n° 13 comprend 28 souris placées séparément dans des bocal. Le groupe A de 15 souris, a reçu par jour 1 biscuit séché pesant 7 g environ. Le groupe B de 13 souris, a reçu quotidiennement 10 g de biscuit séché. Nous avons suivi quotidiennement et pendant 6 jours, la quantité de nourriture absorbée par chaque souris.

2. — Résultats :

GROUP E B (10 g)

GROUPE A (7 g)							GROUPE B (10 g)						
Jours de la semaine							Jours de la semaine						
N° des souris	V.	S.	D.	L.	Ma.	Me.	N° des souris	V.	S.	D.	L.	Ma.	Me.
1	+	+	+	+	+	+	1	4	3,5	3	3	3	3,5
2	+	+	+	+	+	+	2	2	3,5	4	3	3	3
3	+	+	+	+	+	+	3	2,5	4	3	3,5	3,5	3,5
4	+	+	+	+	1 g	+	4	3	3	4,5	3	2,5	4
5	+	+	2 g	+	1 g	+	5	2,5	4	10	3	3	3,5
6	+	+	7 g	+	+	+	6	3	3	4	3,5	3	3
7	+	+	1,5 g	+	+	+	7	3	3	2	3	3	3
8	+	+	2 g	+	+	+	8	2	5	4	3	3,5	3
9	+	+	1 g	+	+	+	9	2	4	4	3	3,5	4
10	+	+	+	+	+	+	10	2	3,5	3	3,5	3,5	3
11	+	+	+	7 g	+	+	11	2,5	10	3	4	3	3
12	+	+	+	+	+	+	12	2,5	3	8	3,5	3	3
13	+	1 g	+	+	1 g	+	13	3	3,5	4,5	3	3,5	3
14	+	+	+	+	+	+							
15	+	+	1,5 g	+	+	+							

+ absorption complète du biscuit.
(3 g) poids du biscuit non absorbé (en grammes).

3. — *Discussion* :

Pour le groupe A, nous remarquons que la souris n° 5 n'a pas absorbé de biscuits le troisième jour, et la souris n° 11 le quatrième jour. Toutes les souris ont absorbé normalement 7 g de biscuits séchés, excepté 6 souris qui, pendant un ou deux jours du traitement, ont laissé un résidu qui n'a pas dépassé 2 g.

Pour le groupe B, nous voyons que le régime est très mal équilibré : aucune souris n'a absorbé complètement le biscuit de 10 g. 4 souris seulement ont absorbé 8 g de biscuits. Il semble donc qu'une boulette de 7 g représente une ration normale et quotidienne pour une souris.

B. — **Matières premières**

1) LA VIANDE

Nous avons procédé à la recherche des résidus œstrogéniques dans la viande de poulet désossé. Nous aurions pu utiliser seulement la peau et la graisse. Mais pour la peau, l'inconvénient majeur est la difficulté d'obtenir des biscuits convenables; quant à la graisse, elle n'est pas toujours présente en quantité suffisante pour permettre une recherche normale. Nous verrons, par la suite, que la graisse et la peau renferment des quantités non négligeables de résidus œstrogéniques.

La viande est retirée des différentes parties de la volaille, passée au hachoir et mêlée intimement à la farine pour souris.

Cette méthode présente l'inconvénient de nécessiter un prélèvement de viande important sur le poulet.

2) LES FOIES

Nous avons pensé, en nous fondant sur le métabolisme des œstrogènes, que la substance administrée au poulet pouvait être mise en évidence dans le foie, qui est très chargé en lipides susceptibles de concentrer les substances liposolubles. Nous avons utilisé des foies provenant de poulets traités par des quantités connues d'œstrogènes.

Les foies sont administrés aux souris et on recherche d'une part, si on peut y doser les œstrogènes résiduels, et d'autre part, quelle est la sensibilité de la méthode.

a) *Technique :*

Nous utilisons des poussins mâles d'un jour que nous élevons pendant six à sept semaines; nous obtenons des poulets pesant environ 1,700 kg. Les poulets sont alors sacrifiés et les foies prélevés; ceux-ci sont hachés séparément; on ajoute une quantité égale de farine pour souris afin d'obtenir des boulettes qui sont séchées à l'étuve à 100° pendant trente minutes. Ces biscuits sont alors distribués à des souris femelles impubères, âgées de vingt-et-un jours, mises en cage indépendamment ou par groupes.

b) *Résultats :*

1) *Etude des foies*
contenant 1 milligramme d'œstrogènes synthétiques/kg

Nous élevons huit poulets mâles : quatre servent de témoin et quatre reçoivent une nourriture complète contenant 0,001 g d'œstrogènes synthétiques par kilogramme.

Le foie de chaque poulet est administré sous forme de biscuits à une seule souris et pendant sept jours. L'expérience avait montré qu'un foie représente juste sept à huit jours de ration.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau XI

	T = 0	Groupe 1 mg/kg
Poids des utérus en mg sacrifiés au huitième jour	15 16 16 17	29 46 50 32
Moyenne	16	39
Déviati on standard	0,8	10,3

DISCUSSION

Le groupe témoin est très homogène. Le groupe traité l'est moins.

L'étude de variance, avec seulement ces huit souris, est cepen-

gant hautement significative ($F = 20$). Il y a donc moins de une chance sur cent pour que la différence entre les groupes soit due au hasard.

CONCLUSION

La dose de 1 mg d'œstrogène dans un kilogramme de ration de poulets de chair est facilement mise en évidence avec quatre foies de poulet (et quatre témoins authentiques).

2) Confirmation des résultats avec des doses moindres d'œstrogènes

A la suite de cet essai, nous nous sommes proposé de faire une nouvelle étude, en nous fondant sur les résultats obtenus précédemment avec la viande, c'est-à-dire que les groupes de souris alimentées avec des boulettes de foie étaient sacrifiées au deuxième jour du traitement. Cette étude fut effectuée avec des doses moindres d'œstrogènes; les résultats ont été les suivants :

Tableau XII

Utérus mg	T = 0	A = 0,7 mg/kg	B = 0,8 mg/kg	C = 0,9 mg/kg
»	8	17	26	25
»	10	17	28	26
»	9	18	29	28
»	11	20	30	29
Moyenne	9,5	18	28	27
Variance	1,29	1,41	1,73	1,81
Coef. var.	13 p. 100	8 p. 100	6 p. 100	7 p. 100

DISCUSSION

Chacun des groupes de quatre est remarquablement homogène. Cette homogénéité est nettement supérieure pour les groupes traités que dans l'étude précédente, sans doute parce que le

temps ici n'a pas pu jouer de rôle perturbateur, et que la réponse est plus nette.

Les analyses de variances montrent que tous les groupes de quatre sont significativement différents entre eux, sauf le B et le C qui ont seulement 35 p. 100 de chance d'être différents.

CONCLUSION

Nous constatons que la recherche dans le foie permet une détection accélérée des œstrogènes; mais du fait de son utilisation importante en gastronomie (pâtée de foie de volailles), cet organe peut être déjà prélevé au moment des essais.

Il est donc important de pouvoir rechercher les résidus œstrogéniques aussi bien dans le foie que dans la viande des volailles.

C. — Mise au point d'un régime avec des quantités variables de viande

a) *Technique* :

Nous utilisons un lot de trente-deux souris divisé en deux groupes :

— Le *premier groupe* comprenant seize souris recevra un premier régime composé de trois parties de viande pour une partie de farine auquel on a ajouté 40 μ g d'œstrogènes synthétiques par kilogramme de viande.

— Le *deuxième groupe* comprenant seize souris recevra un deuxième régime composé de parties égales de viande et de farine additionnés de 40 μ g d'œstrogènes synthétiques par kilogramme de viande.

Les boulettes de neuf grammes ainsi obtenues sont passées à l'étuve à 100° pendant trente minutes.

Les souris sont placées séparément dans un bocal; chaque souris reçoit un biscuit par jour pendant sept jours, le huitième jour toutes les souris sont sacrifiées.

b) *Résultats* :

Ils sont donnés dans le tableau suivant :

Septième lot

Premier régime :

Viande de poulets 3 parties
Farine 1 partie + 40 µg/kg d'œstrogènes synthétiques

Deuxième régime :

Viande de poulets } parties égales + 40 µg/kg
Farine } d'œstrogènes synthétiques

Souris sacrifiées au huitième jour.

Tableau XIII

PREMIER REGIME				DEUXIEME REGIME			
Œstrogène : 40 µg		Témoin (œstrog. 0)		Œstrogène : 40 µg		Témoin (œstrog. 0)	
Souris (g)	Poids utérus (mg)	Souris (g)	Poids utérus (mg)	Souris (g)	Poids utérus (mg)	Souris (g)	Poids utérus (mg)
17	65	14	13	16	29	17	15
14	80	14	14	16	25	14	13
14	76	18	20	16	58	17	24
14	31	17	25	16	26	15	14
14	46	17	23	17	25	16	19
13	43	17	43	18	45	15	18
16	58	18	39	16	26	15	17
14	65			18	46	17	14
17	46						
Total	560	Total	177	Total	280	Total	134
Moyenne ..	62	Moyenne ..	25	Moyenne ..	35	Moyenne ..	16

c) *Discussion* :

Avec des quantités équivalentes d'œstrogènes, nous obtenons :

— pour le premier régime :

des résultats très satisfaisants; mais il y a une variation importante du poids de l'utérus (62 mg entre le poids le plus léger et le plus lourd);

— pour le deuxième régime :

les résultats sont assez nets; les poids sont plus groupés que dans le premier régime : il y a une différence de 33 mg entre le poids de l'utérus le plus lourd et le plus léger.

D. — **Mise au point d'un régime avec des quantités égales de viande**

a) *Technique* :

Nous étudions encore deux régimes :

— Premier régime comprenant trois parties de viande pour une partie de farine additionnée de 40 μ g d'œstrogènes synthétiques par kilogramme de viandes.

— Deuxième régime comprenant également trois parties de viande pour une partie de farine avec addition de 20 μ g d'œstrogènes par kilogramme de viandes.

Les boulettes de 9 g sont séchées à l'étuve à 100° pendant trente minutes. Chaque souris absorbe un biscuit par jour.

Dans chaque lot, une partie des souris est sacrifiée, le cinquième jour, l'autre partie le huitième jour.

b) *Résultats*

Les résultats sont donnés dans le tableau suivant :

Neuvième lot

Premier régime :

Viande de poulets	3 parties	}	+ 40 μ g/kg œstrogènes
Farine	1 partie		

Deuxième régime :

Viande de poulets	3 parties	}	+ 20 μ g/kg œstrogènes
Farine	1 partie		

Tableau XIV

PREMIER REGIME						DEUXIEME REGIME			
Cinquième jour			Huitième jour			Cinquième jour		Huitième jour	
Souris (g)	Témoins		Témoins		Souris (g)	Estrogènes 40 µg/kg		Estrogènes 20 µg/kg	
	Poids utérus (mg)	Poids utérus (mg)	Poids utérus (mg)	Poids utérus (mg)		Souris (g)	Poids utérus (mg)	Souris (g)	Poids utérus (mg)
12	12,4	31,4	15	15	15	15	24,8	17	23,4
13	10,2	36,6	14	14	14	15	26,6	17	27,8
14	15,7	34,2	16	11	15	15	21,0	16	22,0
			16	9,6	17			16	25,4
			16,5	13,6	15			16	27,4
			15	11,4	17			17	20,6
			16	8	17			17	29,4
13	12,7	34	15,5	11	16	15	24	16,5	25,1

c) Conclusion

De ces deux séries d'essais nous pouvons conclure qu'il est préférable d'utiliser le régime constitué par trois parties de viandes pour une partie de farine, utilisée comme liant, car :

— Les résultats sont plus nets pour 40 μ g et 20 μ g d'œstrogènes par kilogramme, l'œstrogène se trouvant ainsi moins dilué.

— Les biscuits sont plus rapidement préparés, puisqu'il est inutile d'ajouter de l'eau.

— Aux fortes doses les résultats sont sujets à de fortes variations, mais aux doses faibles, les poids des utérus sont bien groupés.

6) Évolution du poids de l'utérus en fonction du temps

a) Technique :

Nous avons utilisé un lot de cinquante souris femelles impubères, âgées de vingt-et-un jours environ. Chaque souris, séparément dans un bocal après pesée, absorbe un biscuit par jour composé de trois parties de viandes pour une partie de farine. Les souris sont sacrifiées par lot de dix, les deuxième, troisième, quatrième, cinquième, huitième jour, leurs utérus sont prélevés, placés dans le soluté physiologique et pesés après essorage au papier filtre.

b) Résultats :

Ils sont résumés dans le tableau suivant. Nous donnons la moyenne des poids d'utérus en milligrammes.

Tableau XV

Souris	Nombre de souris sacrifiées	Moyenne poids utérus (mg)
2 ^e jour	10	9,1
3 ^e jour	10	11,6
4 ^e jour	10	13,3
5 ^e jour	10	14,9
8 ^e jour	10	17,5

c) Conclusion

Les poids des utérus augmentent en moyenne de un à deux milligrammes par jour. Cette constatation permet de penser qu'il faut rechercher une méthode de dosage qui consiste à sacrifier les souris dès que possible afin d'éviter le rôle perturbateur du temps. Nous verrons, par la suite, que cette constatation sera entièrement justifiée.

7) Histologie

Il était intéressant de vérifier que l'augmentation du poids de l'utérus n'était pas due à une sécrétion folliculinique d'origine ovarienne. C'est pourquoi nous avons procédé à l'étude histologique des différents ovaires de souris traitées par des œstrogènes et de souris témoins. Nous avons utilisé les souris provenant du lot n° 9.

M. le Professeur Zundel nous a considérablement aidé dans l'interprétation histologique.

A. — Lecture des coupes histologiques

1) Série n° I

Souris sacrifiée le cinquième jour, alimentée avec trois parties de viandes de poulets et une partie de farine sans addition d'œstrogène.

Poids de l'utérus : 12,4 mg.

— Lames n°s 1 à 8 :

follicules primordiaux à divers stades. Pas de follicule mûr.

2) Série n° I bis

Souris âgée de 26 jours qui a reçu dans son alimentation trois parties de viandes plus une partie de farine avec addition de 40 μ g d'œstrogènes synthétiques par kilogramme de viande. Souris sacrifiée le cinquième jour du traitement.

Poids de l'utérus : 31,4 mg.

— Lames n°s 9 à 15 :

les coupes d'ovaires donnent les résultats suivants : follicules primordiaux à divers stades. Pas de follicule mûr, pas de corps jaune.

3) Série n° I ter

Souris femelle de 26 jours, qui a reçu des biscuits composés de viandes et farine additionnées de 20 μg d'œstrogènes synthétiques par kilogramme de viande. Souris sacrifiée au cinquième jour du traitement.

Poids de l'utérus : 24,8 mg.

— Lames n°s 10 à 17 :

uniquement follicules primordiaux. Pas de follicule mûr, pas de corps jaune.

4) Série n° I C

Souris de 29 jours ayant reçu dans son alimentation trois parties de viande plus une partie de farine avec 40 μg d'œstrogènes synthétiques par kilogramme de viande. Souris sacrifiée au huitième jour du traitement.

Poids de l'utérus : 50,4 mg.

— Lames n°s 18 à 26 :

follicules primordiaux à divers stades. Pas de follicules mûrs, pas de corps jaune.

5) Série n° I D

Souris femelles de 29 jours. Nourriture : viande plus farine plus 20 μg d'œstrogènes synthétiques par kilogramme. Souris sacrifiée au huitième jour du traitement.

Poids de l'utérus : 29,4 mg.

— Lames n°s 27 à 33.

follicules primordiaux à divers stades. Pas de follicule mûr, pas de corps jaune.

6) Série n° I B

Souris femelle de 29 jours utilisés comme *témoin* : nourriture : biscuits composés de viandes et farine.

Poids de l'utérus : 15 mg.

— Lames n°s 28 à 32.

follicules primordiaux à divers stades. Pas de follicule mûr, pas de corps jaune.

B. — Discussion

Nous n'avons jamais trouvé, dans nos différentes coupes, ni follicule mûr, ni corps jaune. Nous sommes donc bien en présence de souris femelles impubères; et l'augmentation du poids de leur utérus est due uniquement à l'addition d'œstrogènes synthétiques dans leurs aliments.

Conclusion : technique adoptée

Les souriceaux femelles, âgées de 21 jours, pesant dix grammes environ sont nourries pendant plusieurs jours (en principe sept jours) en recevant chaque jour un biscuit composé de trois parties de viandes à analyser et une partie de farine pour former le liant. Les additions éventuelles d'œstrogènes sont faites sous forme de dilution solide dans la farine. Le huitième jour, les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale et autopsiées. Les utérus sont soigneusement prélevés, placés dans le soluté physiologique, puis pesés à la balance de précision après essorage au papier filtre.

III. — MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE AVEC DES ŒSTROGÈNES SYNTHÉTIQUES — INFLUENCE DE LA DURÉE DU TRAITEMENT ET DE LA DOSE D'ŒSTROGÈNE

De nombreux auteurs affirment que les épreuves biologiques sont trop longues pour permettre un dépistage dans une éventuelle inspection des denrées alimentaires. Nous avons tenté de rechercher une méthode rapide, et nos efforts se sont portés sur le temps d'élevage des souris qui permettrait une lecture très rapide des résultats.

A) Recherches liminaires

1. — Nous avons utilisé des souriceaux de 21 jours (lot de souris n° 18) dont le poids est environ dix grammes avec des écarts maximums de un à deux grammes.

Chaque souris est placée dans un récipient individuel. Sa nourriture est composée de :

- viande de poulets : 3 parties,
- farine servant de liant : 1 partie.

Les souris traitées reçoivent des boulettes additionnées d'œstrogènes synthétiques (stilbœstrol + hexanœstrol) à raison de 40 μg par kilogramme de viandes : chaque souris placée séparément reçoit journallement une boulette de neuf grammes environ séchée à l'étuve à 100° pendant une demi-heure.

Le huitième jour, les souris sont sacrifiées; les utérus sont pesés : les résultats sont les suivants :

Tableau XVI

Témoins : œestrogènes : 0		œestrogènes : 40 microg/kg	
Souris (g)	Utérus (mg)	Souris (g)	Utérus (mg)
13	9,4	11	22,1
13	10,6	11	41,6
14	10	11	46,3
14	15	11	30,2
15	17	12	28,0
15	10,2	12	30,3
16	13,2	12	47,4
16	21,4	12	49,0
17	10,4	13	60,4
19	20,6	15	44,6
Total : 152	Total : 137,8	Total : 120	Total : 399,9
Moyenne : 15,2	Moyenne : 13,8	Moyenne : 12,0	Moyenne : 40,0
Dev. stand. : 1,15	Dev. stand. : 4,46	Dev. stand. : 1,24	Dev. stand. : 3,75

DISCUSSION

a) *Pour les poids :*

— Dans chaque lot, l'ensemble des résultats est suffisamment homogène pour que l'on puisse considérer la moyenne arithmétique comme valable. Nous avons cependant soumis les chiffres obtenus au calcul statistique.

— L'analyse des variances montre que les populations qui, au départ, étaient comparables, donnent des échantillons très significativement différents, la concentration d'œstrogène, (40 μg par kilogramme de viande) retarde certainement la croissance de ces souris.

b) *Pour les utérus :*

— Dans chaque lot, l'ensemble des résultats est suffisamment homogène pour que l'on puisse considérer la moyenne arithmétique comme valable.

— L'analyse des variances montre que les populations, comparables au départ, donnent des échantillons très significativement différents. La concentration d'œstrogène augmente certainement la croissance de l'utérus des souris (40 μg par kilogramme de viande).

— A cette concentration, le poids de l'utérus peut être pris comme épreuve.

c) *Pour le rapport poids/utérus*

— Les études de facteur de corrélation montrent que dans chacun des lots, comme dans l'ensemble, il y a une certaine corrélation inverse entre le poids du corps et celui de l'utérus.

— Ce rapport diminue sous l'action des œstrogènes, puisque l'utérus augmente de poids.

2. — Dans la précédente expérience, nous avons choisi comme point de départ une quantité d'œstrogène égale à 40 μg par kilogramme de viande. Dans cette série (lot de souris n° 19) nous avons doublé la quantité d'œstrogène, c'est-à-dire que nous avons utilisé des boulettes de viande contenant 80 μg par kilogramme de viande. En même temps, nous avons nourri une deuxième série de souris avec des boulettes de viande contenant 40 μg par kilo-

gramme de viande, ce qui nous a permis de noter les écarts entre les différents résultats.

Nombre de souris utilisées : trente souris.

Régime : 3/4 de viande + 1/4 de farine.

Durée : huit jours. Les souris sont séparées. Une boulette par souris.

— Troisième lot : T = 0 A = 40 μ g B = 80 μ g

Les résultats sont les suivants :

Tableau XVII

T = 0		A = 40 μ g		B = 80 μ g	
Souris (g)	Utérus (mg)	Souris (g)	Utérus (mg)	Souris (g)	Utérus (mg)
14	14	14	69	13	113
15	15	13	53	13	89
14	20	14	60	13	88
13	18	14	47	14	96
14	17	14	73	14	87
14	13	12	73	12	88
15	22	13	51	13	50
16	21	13	81	14	82
13	16	13	48	15	96
13	15	14	42	16	90
Total :	Total :	Total :	Total :	Total :	Total :
141	171	134	647	137	879
Moyenne :	Moyenne :	Moyenne :	Moyenne :	Moyenne :	Moyenne :
14,1	17,10	13,4	64,7	13,3	87,9

DISCUSSION

Les concentrations d'œstrogènes (40 et 80 μ g par kilogramme) augmentent la croissance de l'utérus des souris.

Pour le groupe B, la variation des poids d'utérus est importante : ceci est dû au fait que les utérus de certains sujets sous l'action des œstrogènes augmentent considérablement de volume avec vascularisation et formation de liquide. Il se produit en même temps une kératinisation vaginale.

3. — Une troisième série d'expériences a été entreprise (lot de souris n° 20) à la suite des résultats précédents. Les conditions expérimentales sont les mêmes :

— Souris placées séparément.

— Souris alimentées avec des boulettes formées de 3/4 de viande et 1/4 de farine, pendant sept jours.

— Souris tuées le huitième jour.

4 lots : T = 0 A = 10 $\mu\text{g/kg}$ B = 20 $\mu\text{g/kg}$ C = 40 $\mu\text{g/kg}$

Les résultats sont les suivants :

Tableau XVIII

T = 0		A = 10		B = 20		C = 40	
Souris (g)	Utérus (mg)	Souris (g)	Utérus (mg)	Souris (g)	Utérus (mg)	Souris (g)	Utérus (mg)
11	9	12	11,2	11	36,8	12	34
12	11,4	12	14,1	12	19,8	12	34,4
12	11,4	13	12,4	12	25,2	12	45,4
12	14,6	13	14	12	26,4	12	53
13	9	13	14,2	12	31	13	22,4
13	15,6	13	16,4	12	35	13	29,6
14	10,4	14	9,8	12	38,6	13	72,8
14	13	14	15,2	12	40	15	21,4
14	14	14	17	12	51	15	61,2
15	12	14	17,4				
15	17,6						
x 13,2	12,5	13,2	14,2	11,9	33,7	13,0	41,6
s 1,34	2,72	0,82	2,31	0,3	9,27	1,22	17,8

DISCUSSION

1) Poids des souris

— L'analyse des variances pour l'ensemble montre qu'il y a environ trois chances sur cent seulement que cet échantillon provienne de la même population.

— L'analyse des variances des trois lots T, A et C montre qu'il y a plus de soixante-dix chances sur cent que ces trois lots appartiennent à la même population.

— Par conséquent l'étude du poids des souris ne montre pas une corrélation valable avec la concentration en œstrogènes; ce facteur ne peut donc être étudié seul.

2) Poids de l'utérus

— L'application des « tests de probits » donne des courbes convenablement rectilignes.

— L'analyse des variances montre qu'il y a moins de une chance sur cent pour que tous les lots proviennent d'une même population.

— Le calcul des limites fiduciaires donne les résultats suivants, pour la position de la moyenne supposée de la population dont serait tirée au hasard chacun des lots :

Tableau XIX

Lot	T	A	B	C
Limite inférieure	10,7	12,5	26,6	28,0
Limite supérieure	14,3	15,8	40,8	55,3

On voit que les lots B et C se distinguent définitivement du lot T et du lot A. On peut en conclure que la sensibilité de la méthode est presque aussi bonne pour 20 µg/kg que pour 40 µg/kg.

Mais les résultats sont beaucoup moins probants pour le groupe A. Il y a seulement dix chances sur cent que les deux lots T et A appartiennent à la même population; on peut donc dire que la limite de sensibilité de la méthode serait (pour des lots de dix souris) de l'ordre de 20 µg d'œstrogène par kilogramme de viande.

4. — Devant l'incertitude des résultats concernant le groupe de souris traité par 10 µg par kilogramme d'œstrogène synthétique, nous avons modifié quelque peu notre méthode.

Les conditions expérimentales sont les suivantes (lot de souris n° 21) :

— Les souris sont alimentées pendant neuf jours (au lieu de sept) avec des boulettes de viande composées de 3/4 de viande et

1/4 de farine additionnées de 10 μg d'œstrogènes synthétiques par kilogramme (stilbœstrol + hexanœstrol).

— Souris impubères placées séparément.

— Souris tuées le dixième jour.

— Deux lots de dix souris : $T = 0$ et $A = 10 \mu\text{g/kg}$.

Les résultats sont les suivants :

Tableau XX

$T = 0$		$A = 10 \mu\text{g/kg}$	
Souris (g)	Utérus (mg)	Souris (g)	Utérus (mg)
14	14	13	20
14	12	13	21
15	15	14	19
15	20	14	22
15	19	14	22
15	13	14	19
15	16	14	23
16	19	15	25
16	20	15	25
16	15	16	20
X 15,1	16,3	14,2	21,6

DISCUSSION

Le lot traité diffère très significativement du lot témoin. Mais, l'intérêt de cette expérience est limité parce que l'épreuve biologique est trop longue (10 jours) et qu'il faut faire un prélèvement très important de viande pour obtenir et préparer quatre-vingt dix boulettes de viande pour un lot de dix souris.

CONCLUSION

Des lots de dix souris sont entretenus individuellement pendant 8 jours, en recevant de la viande à raison de 3/4 de la ration sous forme de biscuit. La sensibilité de la méthode utilisée est

limitée à 20 μg d'œstrogènes synthétiques par kilogramme de viande. Si des lots de dix souris sont entretenus pendant 10 jours, nous abaissons la sensibilité de la méthode à 10 μg d'œstrogènes synthétiques par kilogramme de viande.

B. — Recherche d'une méthode simplifiée avec la viande de volaille

La méthode que nous venons de décrire a bien des inconvénients : elle est longue (huit à dix jours); elle nécessite beaucoup de matériel (bocaux individuels) beaucoup de travail (entretien des souris, préparation de nombreux biscuits).

1) Cohabitation

Nous avons d'abord essayé de vérifier si la cohabitation de dix souris d'un lot dans une cage entraîne une modification de la valeur statistique des résultats. Comme la réponse était satisfaisante, c'est en usant de cette simplification que nous avons toujours opéré par la suite.

2) Influence de la température

Les souris, isolées dans un bocal, sont nettement plus sensibles, à des écarts de température que celles qui se trouvent en groupes dans une cage.

Les souris placées séparément dans un bocal ont besoin d'une température égale ou supérieure à 18°, si nous voulons obtenir des résultats satisfaisants. Au-dessous de 15°, sur un groupe de 40 souris, 10 meurent dans les 48 heures; 10 perdent quotidiennement du poids; le reste du groupe subsiste mais en donnant des résultats inégaux quant aux poids de leurs utérus, qui ne peuvent être pris en considération.

Si les souris sont en groupes, elles supportent des températures moins élevées, et à 15°, nous n'avons noté ni morts, ni influence sensible sur le poids des utérus.

3) Durée de l'expérience

D'autre part, nous avons voulu vérifier quelles étaient les réponses des utérus au cours du temps et en fonction de la dose d'œstrogène.

Il y a, dans cette expérience, quatre groupes totalisant cinquante-quatre souris femelles impubères, âgées de 21 jours.

Le lot A reçoit des biscuits renfermant 10 μg d'œstrogènes

synthétiques par kilogramme; le lot B 20 μg d'œstrogènes, et le lot C 40 μg d'œstrogènes synthétiques par kilogramme.

Dans chaque lot trois ou quatre souris ont été sacrifiées le quatrième, sixième, huitième et dixième jour; la répartition des souris dans chaque lot est la suivante :

Tableau XXI

Jour	Nombre de souris sacrifiées			
	Lot témoin	Lot A = 10	Lot B = 20	Lot C = 40
1 ^{er} jour	/	/	/	/
2 ^e jour	/	/	/	/
3 ^e jour	/	/	/	/
4 ^e jour	3	3	3	3
5 ^e jour	/	/	/	/
6 ^e jour	3	4	3	3
7 ^e jour	/	/	/	/
8 ^e jour	3	4	3	3
9 ^e jour	/	/	/	/
10 ^e jour	4	4	4	4
Total souris	13	15	13	13 = 54 souris

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant, indiquant la moyenne des poids des utérus (arrondis au milligramme le plus proche) :

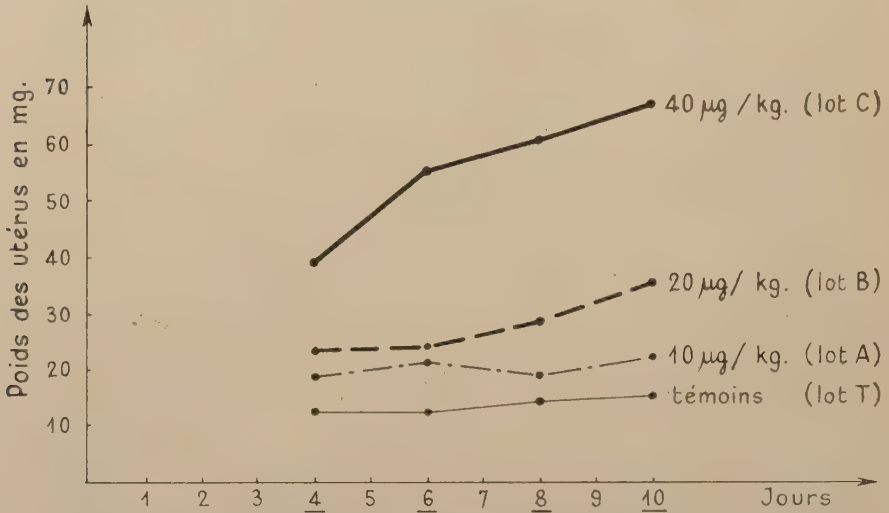
Tableau XXII

Jour de sacrifice	T = 0	A = 10	B = 20	C = 40
4	12	20	23	39
6	12	21	23	55
8	14	19	28	60
10	15	22	35	66

DISCUSSION

Ces résultats confirment les précédents : sous réserve d'un nombre plus petit d'individus dans chaque sous-groupe, on peut mettre en évidence la présence de $10\text{ }\mu\text{g}$ d'œstrogène dans un kilogramme de viande de poulet (ou autre volaille).

Etudions le graphique suivant en mettant en abscisse les jours et en ordonnée le poids des utérus.



Le poids des utérus ne semble pas se modifier beaucoup du quatrième au dixième jour sauf pour le lot C. Or ce dernier est le moins intéressant car éloigné de la limite de sensibilité.

Il semble qu'entre T et A la différence diminue du sixième au huitième jour. Il est donc nécessaire de chercher à mettre en évidence une réponse plus précoce encore.

C. — Recherche de précocité

1) Recherche de précocité à forte concentration

Lot n° 32

a) Technique :

Ce lot comprend trente souris femelles impubères, pesant environ dix grammes et âgées de 21 jours. Il est séparé en trois groupes :

- Un groupe témoin de dix souris.
- Un groupe A de dix souris qui recevra des biscuits constitués par trois parties de viande et une partie de farine additionnées de 20 μg d'œstrogènes synthétiques par kilogramme de viande.
- Un groupe B également de dix souris recevra des biscuits constitués par trois parties de viande et une partie de farine additionnées de 40 μg d'œstrogènes synthétiques par kilogramme.

Chaque souris reçoit un biscuit par jour.

Les souris qui ont été groupées par lot sont sacrifiées au deuxième jour du traitement.

b) Résultats :

Les poids des utérus sont donnés en milligramme :

Tableau XXIII

T = 0	A = 20 $\mu\text{g/kg}$	B = 40 $\mu\text{g/kg}$
10	16	22
09	25	25
09	25	17
10	16	19
12	18	20
12	18	29
12	24	29
08	23	17
08	24	22
10	20	22
Moyenne : 10	21	22,2

c) Discussion :

Le poids des utérus s'est déjà suffisamment modifié pour affirmer de façon certaine que le délai de deux jours permet de retrouver des additions de 20 et 40 $\mu\text{g/kg}$ d'œstrogènes synthétiques dans la nourriture des volailles (ou autres animaux).

2) Recherche de précocité à faible concentration

Lot n° 30

Ce lot comprend quarante-deux souris femelles impubères, âgées d'environ 21 jours. Il est séparé en deux groupes T = 0 et A = 10 $\mu\text{g/kg}$. Chaque groupe se trouve dans une cage.

Les deuxième, troisième, quatrième et sixième jour, on sacrifie les souris, et on pèse leur utérus. Les résultats sont donnés en détail dans le tableau suivant :

Tableau XXIV

Jour de sacrifice	Nombre de souris sacrifiées	T = 0		A = 10 μ g		Ecart
		Moyenne (au mg le voisin)		Moyenne (au mg le voisin)		
2 ^e	12	07 10 07 08 10 11	9	22 23 23 18 22 21	21 =	12
3 ^e	10	10 15 10 10 13	12	26 22 24 21 25	24 =	12
4 ^e	8	11 13 17 17	14	28 23 20 19	23 =	9
6 ^e	12	16 19 15 17 20 17	17	20 33 20 27 26 28	26 =	9

DISCUSSION

Cela confirme les résultats que nous avons obtenus précédemment. Au deuxième jour, il apparaît une nette différence entre les poids des utérus. L'analyse des variances montre que les jours suivants, cette différence persiste, mais elle n'est plus aussi nette, l'écart avec les témoins diminuant (surtout à partir du quatrième jour).

3) Vérification au deuxième jour et à faible concentration

A la suite des essais précédents, nous avons voulu confirmer la valeur du résultat au deuxième jour pour 10 μg d'œstrogènes synthétiques en utilisant un plus grand nombre de souris.

D'autre part, nous avons recherché si une dose inférieure (soit 5 μg d'œstrogènes synthétiques par kilogramme de viande) ne provoquait pas une réponse visible au deuxième jour.

Quarante souris ont été divisées en trois groupes :

— Un groupe témoin comprenant douze souris.

— Un groupe A, composé de quatorze souris, reçoit des biscuits composés de trois parties de viande pour une partie de farine additionnée de 5 μg d'œstrogènes synthétiques par kilogramme.

— Un groupe B, composé également de quatorze souris, reçoit des biscuits additionnés de 10 μg d'œstrogènes synthétiques par kilogramme.

Les souris sont placées ensemble pour chaque groupe. Elles sont toutes sacrifiées au deuxième jour; les utérus sont prélevés et pesés.

Les résultats sont les suivants; les poids d'utérus sont toujours donnés en milligramme :

Lot n° 31

Tableau XXV

Nombre de souris	T = 0	Nombre de souris	A = 5 μg	Nombre de souris	B = 10 μg
12	7	14	18	14	17
	11		14		22
	12		12		22
	12		18		30
	14		22		29
	9		17		32
	11		22		28
	12		22		26
	12		16		21
	14		22		19
	09		18		24
	13		15		30
			12		28
			18		29
	11		17		25

DISCUSSION

L'analyse des variances entre T et A, et, bien entendu, entre T et B, permet de montrer que les deux groupes T et A n'appartiennent pas à la même population.

De ce fait la pesée des utérus au deuxième jour permet de mettre en évidence au moins 5 μg d'œstrogènes synthétiques dans 1 kilogramme de viande.

D. — Conclusion

L'ensemble de ces résultats nous amène aux conclusions suivantes :

1°) On peut laisser des groupes de dix à vingt souris ensemble dans une cage, ce qui simplifie beaucoup le travail.

2°) Dès le deuxième jour il apparaît une différence significative dans le poids des utérus de souris traitées ou non traitées.

3°) En utilisant des groupes de quatorze souris, on obtient une différence significative pour une alimentation comprenant une addition de 5 μg d'œstrogènes synthétiques par kilogramme de viande.

En conséquence, nous avons là une technique qui permet de faire rapidement et sûrement le contrôle des viandes (de volaille) du point de vue de leur teneur en œstrogènes. Cela reste pareillement valable pour toutes les denrées qui peuvent être consommées par les souris (aliments du bétail notamment).

IV. — MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE AVEC LES ŒSTROGÈNES NATURELS

1) Introduction

Nous avons mis au point une méthode simple et rapide de dépistage des résidus œstrogéniques dans la viande ou le foie de poulets (ou autre volaille) nourris avec des farines supplémentées par des œstrogènes de synthèse (stilbœstrol et hexanœstrol).

Notre étude serait incomplète si nous ne vérifions pas de façon précise que notre méthode permet également de détecter des résidus œstrogéniques dans la viande ou le foie de poulets

nourris avec des farines supplémentées, cette fois-ci, par des œstrogènes naturels.

2) Technique

Identique à celle employée pour les œstrogènes synthétiques nous utilisons des souris femelles impubères âgées de 21 jours. Les souris sont placées ensemble ou séparément. La nourriture est composée de 3/4 de viande de poulets plus 1/4 de farine U.A.R. servant de liant. Les souris sont sacrifiées au deuxième jour du traitement, leurs utérus prélevés et pesés.

a) Lot de souris n° 40

Un lot de trente souris femelles impubères, âgées de 21 jours environ a été divisé en trois groupes :

— premier groupe T : Témoin comprenant dix souris.

— deuxième groupe A : Composé de dix souris recevant des biscuits additionnés de 25 μg de dihydrofolliculine par kilogramme de viande.

— troisième groupe B : Composé de dix souris recevant des biscuits additionnés de 50 μg de dihydrofolliculine par kilogramme de viande.

Les souris reçoivent un biscuit par jour et par souris. Dans chaque lot, cinq souris sont sacrifiées le deuxième jour, et cinq souris le troisième jour afin d'étudier l'évolution du poids des utérus au cours du temps et en fonction de la dose d'œstrogène.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant; les poids des utérus de souris sont donnés en milligramme.

Tableau XXVI

Jour	Nbre de souris sacrifiées	T = 0	Moyenne	A = 25 μg	Moyenne	B = 50 μg	Moyenne
2 ^e	15	10 09 09 09 12	9,8	15 15 14 15 16	15	20 19 19 20 19	19,4
3 ^e	15	16 16 10 14 14	14	21 14 17 29 16	19,4	32 26 31 23 28	28

CONCLUSION

Les lots A et B se distinguent statistiquement du lot T aussi bien au deuxième qu'au troisième jour. Il n'est pas nécessaire de sacrifier les souris au troisième jour.

Nous pouvons conclure que la sensibilité de la méthode est aussi bonne pour 25 μg que pour 50 μg .

b) Lot de souris n° 41

Nous avons voulu confirmer les résultats précédents, mais en employant des quantités légèrement inférieures à l'expérience précédente, c'est-à-dire :

Trente souris divisées en *trois* groupes : T = 0, A = 20 μg et B = 40 μg .

Placées ensemble pour chaque groupe, elles sont toutes sacrifiées au deuxième jour. Les résultats sont les suivants :

Tableau XXVII

DEUXIEME JOUR — POIDS UTERUS EN Mg					
T = 0	Moyenne	A = 20 μg	Moyenne	B = 40 μg	Moyenne
10	10	14	15,2	17	18
10		16		17	
09		13		20	
10		14		20	
12		14		20	
10		18		17	
10		14		17	
9		17		17	
10		15		17	
10		17		18	

Les résultats confirment les précédents : avec des lots de dix souris, on peut affirmer qu'une viande de poulet contient de 20 μg à 40 μg d'œstrogènes naturels par kilogramme de viande. Il nous a paru intéressant de voir si une dose inférieure ne provoquerait pas une réponse visible au deuxième jour, d'où l'expérience suivante :

c) Lot de souris n° 42

Lot de trente souris divisé en deux groupes.

— Un groupe témoin de quinze souris.

— Un groupe de quinze souris qui reçoivent des biscuits additionnés de 10 μg d'œstradiol par kilogramme de viande.

Les souris, placées ensemble pour chaque groupe, sont sacrifiées au deuxième jour. Leurs utérus prélevés et pesés. Les résultats sont les suivants :

Tableau XXVIII

DEUXIEME JOUR — POIDS DES UTERUS EN Mg			
Nombre de souris	A = 10 μg	Nombre de souris	T = 0
15	17	15	13
	20		9
	13		9
	14		13
	15		12
	14		12
	11		13
	15		8
	14		8
	15		13
	17		12
	22		11
	18		10
	17		11
	13		11
Moyenne	16		11

La pesée des utérus au deuxième jour permet de mettre en évidence au moins 10 μg d'œstrogènes naturels dans un kilogramme de viande.

3) Conclusion

Nous arrivons donc aux mêmes conclusions que pour l'emploi des œstrogènes synthétiques, à savoir :

1°) On peut laisser des groupes de dix ou quinze souris dans une cage.

2°) On obtient une différence significative pour une alimentation comprenant une addition de 10 μg d'œstrogènes naturels par kilogramme de viande.

3°) Cette méthode permet de donner une réponse 48 heures après l'arrivée du prélèvement au laboratoire.

V. — CONCLUSION : ESSAI QUANTITATIF

A) Généralités

Comme nous avons centré notre travail sur le dépistage systématique et rapide des résidus œstrogéniques dans les viandes, le service de la répression des fraudes désirant connaître seulement si, dans les prélèvements qu'il fait parvenir au laboratoire, il y a infraction ou non au décret du 20 mars 1959, l'intérêt du dosage pourrait paraître secondaire.

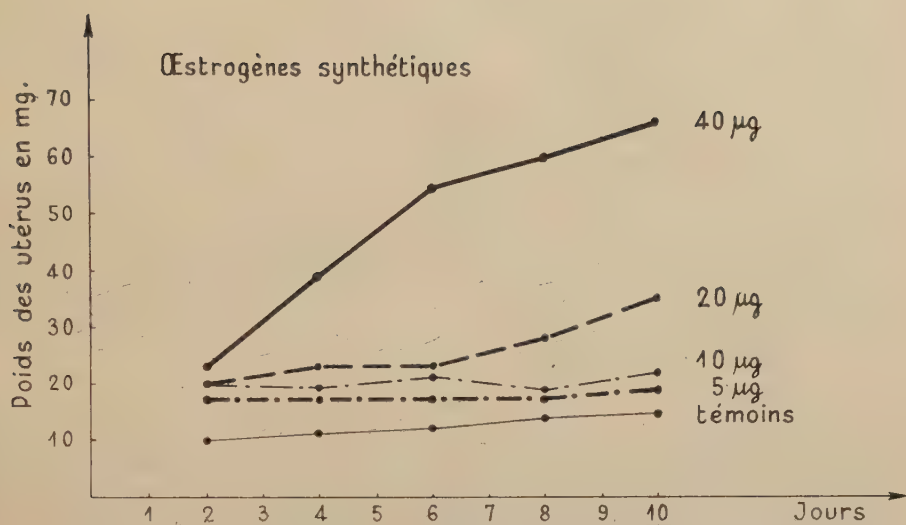
Cependant, une étude sommaire d'un certain nombre de résultats permet, dans une certaine mesure de donner des précisions sur les quantités d'œstrogènes qui existent dans la viande (ou le foie) de volailles.

B) Graphiques

Nous avons tracé un graphique concernant les œstrogènes de synthèse : en abscisse les jours, en ordonnée le poids moyen des utérus en milligramme.

Tableau XXIX

Jours	5 $\mu\text{g/kg}$	10 $\mu\text{g/kg}$	20 $\mu\text{g/kg}$	40 $\mu\text{g/kg}$	Témoins
2 ^e jour	17	21	21	22,2	10
4 ^e jour	17	20	23	39	12
6 ^e jour	18	21	23	55	12
8 ^e jour	17	19	28	60	14



C) Discussion

1) Nous notons d'abord que nous n'avons pas fait mention des résultats au-dessus de 40 µg/kg. Ces résultats sont généralement faussés par le fait que les utérus de souris, sous l'action intense des œstrogènes, augmentent considérablement de volume, avec formation de liquide, vascularisation intense, et kératinisation au niveau de la jonction utéro-vaginale.

2) La technique rapide, que nous avons codifiée : sacrifice des souris au deuxième jour du traitement, ne sert uniquement qu'au dépistage des résidus œstrogéniques. Au deuxième jour, nous pouvons affirmer qu'une viande renferme des œstrogènes de façon certaine; pour 5 µg, 10 µg, 20 µg, 40 µg d'œstrogènes par kilogramme de viande, les poids d'utérus s'élèvent entre 17 mg et 22 mg.

Si nous voulons connaître la quantité approximative d'œstrogènes contenus dans une viande, il est donc nécessaire de continuer l'expérience avec un certain nombre de souris pendant encore deux jours. A cette date :

a) Si les utérus sont en dessous de 20 mg, on peut affirmer que la viande renferme 5 µg d'œstrogène par kilogramme.

b) Si les utérus pèsent environ 20 mg la viande contient 10 μ g d'œstrogène par kilogramme.

c) Si les utérus pèsent environ 25 mg, la viande renferme 20 μ g d'œstrogène par kilogramme.

d) Si l'utérus pèse au-dessus de 35 mg, elle renferme 40 μ g d'œstrogène par kilogramme.

e) Enfin, si l'utérus pèse plus de 50 mg (avec formation de liquide et kératinisation vaginale) la viande contient des doses supérieures à 40 μ g d'œstrogène par kilogramme.

3) Nous ne pouvons pas savoir si nous avons à faire à une quantité importante d'œstrogènes naturels ou à des doses faibles d'œstrogènes synthétiques.

D) Conclusion

Si l'on désire connaître la dose approximative d'œstrogène contenue dans les carcasses, il faut utiliser des lots de quinze souris. Les dix premières souris sont sacrifiées au deuxième jour; et si le résultat est positif, on sacrifie les cinq dernières souris au quatrième jour, ce qui permet de donner la dose approximative d'œstrogène contenue dans la viande (ou le foie) à analyser.

Mais il est surtout important de dépister le plus rapidement possible les fraudes se rapportant au décret du 20 mars 1959.

DEUXIÈME PARTIE

CONSÉQUENCES DE LA CASTRATION CHIMIQUE

a) Introduction

Ayant mis au point une technique rapide et précise pour déceler les œstrogènes ajoutés à la viande, nous allons consacrer ce chapitre à la recherche des effets œstrogéniques sur les jeunes coqs traités soit par insertion de comprimés dans le derme, soit par addition d'œstrogènes dans les aliments.

Nous pourrons ainsi mettre en évidence pour chaque essai une observation clinique précise, des constatations nécropsiques une étude histologique de certains organes (foie, rate), et les variations de poids des poulets témoins et traités.

b) Matériel et nourriture

Nous recevons des poussins mâles d'un jour directement des couveuses de « l'Ile-de-France Ponte ». A leur arrivée, les poussins sont placés dans une cage grillagée chauffante, qui, grâce à un thermostat, permet d'obtenir une température voisine de 25°. A volonté, les poussins sont nourris avec l'aliment complet F.R.A.B. composé de :

- Maïs, avoine, son fin.
- Arachide, soja, tournesol.
- Poisson.
- Luzerne déshydratée.

— *Contenant au maximum :*

Humidité	14	p. 100
Matières cellulosiques	7,5	p. 100
Matières minérales	6,5	p. 100

— *Contenant au minimum :*

Matières protéiques brutes	18 p. 100
Matières grasses	2,5 p. 100

— *Teneurs en vitamines pour 100 kg :*

Vitamine A	880 000 U.I.
Vitamine D 3	540 000 U.I.
Vitamine B 2	720 mg
Vitamine PP	4 000 mg
Vitamine E	300 mg
Vitamine K	100 mg
Vitamine B 12	2 mg
Pantothénate de Ca	700 mg

— Cette farine est supplémentée aux 100 kilogrammes par 1 gramme d'érythromycine.

D'autre part, l'eau leur est donnée à volonté.

Au bout de une à trois semaines d'élevage suivant les cas, nous administrons des œstrogènes :

— soit par insertion de comprimés,

— soit dans les aliments des animaux. La farine est alors mélangée avec la quantité nécessaire d'œstrogène; la mixture est ensuite passée au mélangeur-broyeur pendant vingt minutes afin d'obtenir un mélange parfaitement homogène.

A) **PAR INSERTION DE COMPRIMÉS DANS LE DERME DES VOLAILLES**

1) **Comprimés d'œstrogènes synthétiques (stilbœstrol + hexanœstrol)**

Réception des animaux

Dix-huit poussins mâles nés le 31 mai 1962.

On sépare ces jeunes poussins, dès leur naissance en deux groupes :

— Le groupe I, composé de douze poussins, sera traité ultérieurement.

— Le groupe II, composé de six unités, servira de témoin.

Tous les groupes sont nourris normalement avec l'aliment complet F.R.A.B.

Réalisation des essais

Le 13 juillet 1962, les jeunes coqs du groupe I sont traités de la manière suivante : Nous leur plaçons dans le derme du cou, à l'aide d'un implantateur, un comprimé « stilcoqvrac » composé d'hexœstrol 10 mg, stilbœstrol 5 mg.

Observation clinique

Le 28 juillet, soit environ quinze jours après le traitement apparaissent les premiers signes de régression des caractères sexuels secondaires.

Le plumage est moins brillant, la crête est plus petite que chez les témoins. Le chant est aboli; l'instinct batailleur est supprimé. Environ deux mois après, les animaux sont sacrifiés et permettent les

Constatations nécropsiques suivantes

La première constatation est l'abondance des graisses, mais en même temps on peut affirmer qu'il y a un accroissement des masses musculaires :

- la rate est normale,
- le foie est grumeleux, de couleur orangée,
- les testicules sont atrophiés.

Moyenne des poids des testicules traités	0,267 g
Moyenne des poids des testicules témoins ..	0,750 g

Étude histologique

Du foie : la cellule hépatique est normale, mais il existe une surcharge grasseuse microvacuolaire importante.

Poids des poulets témoins et traités

Chaque poulet traité est numéroté de un à douze. Nous remarquons un accroissement notable du poids des animaux dû à l'augmentation des graisses d'une part, et à l'augmentation des masses musculaires d'autre part.

Tableau XXX

N° du poulet	Poids des poulets vivants	N° du poulet	Poids des poulets vivants
1	1,650 kg	7	1,600 kg
2	1,650 kg	8	1,800 kg
3	1,500 kg	9	1,700 kg
4	1,950 kg	10	1,800 kg
5	1,650 kg	11	1,650 kg
6	1,550 kg	12	1,600 kg
Moyenne		1,675 kg	

Chaque poulet témoin est numéroté de 13 à 18. Le poids de ces poulets est notablement moins élevé que les poulets traités.

Tableau XXXI

N° du poulet	Poids des poulets vivants	N° du poulet	Poids des poulets vivants
13	1,400 kg	16	1,300 kg
14	1,300 kg	17	1,400 kg
15	1,350 kg	18	1,350 kg
Moyenne		1,350 kg	

CONCLUSION

Cette castration chimique implique pour les poulets traités les résultats suivants :

- Régression des caractères sexuels secondaires.
- Foie décoloré par suite d'une surcharge grasseuse,
- Testicules atrophiés.
- Augmentation notable du poids.

2) Comprimés d'œstrogènes naturels (œstradiol)

Nous avons employé également des comprimés composés d'œstrogènes naturels.

Réception des animaux

Nous utilisons douze poussins mâles nés le 15 janvier 1963. On sépare ces jeunes poussins, dès leur naissance en deux groupes :

— Le groupe I, composé de *huit* poulets qui seront traités ultérieurement.

— Le groupe II, formé de *quatre* poulets qui seront utilisés comme témoins.

Réalisation des essais

Le 11 février 1963 les jeunes coqs du groupe I sont traités de la manière suivante :

1) Dans le derme du cou de six poulets, nous plaçons à l'aide d'un implantateur un comprimé composé :

œstradiol 20 mg, progestérone 200 mg,
la progestérone servant à « tamponner » l'activité de l'œstradiol.

2) Afin de pouvoir comparer plus nettement les résultats, deux poulets reçoivent un comprimé « stilcoqvrac » composé d'hexœstrol + stilbœstrol.

Les huit jeunes coqs vivent tous ensemble; les deux poulets traités par des œstrogènes synthétiques sont bagués afin de pouvoir facilement les différencier.

Le groupe traité et le groupe témoin sont nourris normalement et à volonté avec l'aliment complet F.R.A.B.

Observation clinique

— Quinze jours après le traitement :

Pour les deux coqs traités aux hormones synthétiques, apparaissent comme dans l'expérience précédente, les signes classiques de régressions des caractères sexuels secondaires.

Chez les six coqs traités aux hormones naturelles, apparaît une abolition de certains caractères sexuels secondaires, mais moins prononcés que chez les précédents, concernant le plumage et le maintien habituel de l'animal.

Ces constatations sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau XXXII

	Coq traité avec œstrogène naturel	Coq traité avec œstrogène synthétique
Plumage	Normal.	<i>Terne.</i>
Crête	Petite.	Insignifiante.
Chant	Aboli.	Aboli.
Instinct batailleur	Supprimé.	Supprimé.

Constatations nécropsiques

Chez les sujets traités avec des comprimés d'hormones naturelles, il y a formation de graisses abondantes au niveau de la partie postérieure de l'animal, surtout dans la région coccygienne :

- la rate est normale,
- le foie est brun rouge, normal,
- les testicules sont atrophiés.

Moyenne des poids testicules traités 0,315 g

Moyenne des poids testicules témoins 0,785 g

Poids des poulets témoins et traités

Chaque poulet traité est numéroté de un à huit, les témoins étant numérotés de neuf à douze. Nous constatons une augmentation de poids moins importante chez les sujets traités avec des œstrogènes naturels que ceux traités avec des œstrogènes synthétiques.

Les résultats indiquent le poids des volailles :

Tableau XXXIII

Œstrogènes naturels	1	1 500 g	Œstrogènes synthétiques	7	1 680 g
	2	1 475 g		8	1 710 g
	3	1 550 g	Témoins	9	1 400 g
	4	1 600 g		10	1 420 g
	5	1 600 g		11	1 450 g
	6	1 525 g		12	1 375 g

CONCLUSION

Cette « castration » par les implants d'œstrogènes naturels donne les résultats suivants :

- Peu de régression des caractères sexuels secondaires.
- Testicules atrophies.
- Augmentation assez sensible du poids de l'animal.

B) PAR ADDITION D'ŒSTROGÈNES DANS LES ALIMENTS

1) Œstrogènes synthétiques

PREMIÈRE SÉRIE D'ESSAIS

Cette première étude est consacrée à l'action massive sur les jeunes coqs d'œstrogènes de synthèse, qui nous permettent de déceler les principaux accidents relatifs à cette ingestion importante.

Technique

Dix poussins mâles nés le 8 septembre 1961.

— Un groupe I sert de témoin.

— Un groupe II est utilisé comme animaux d'expériences.

Nourriture

Ces deux groupes reçoivent la même nourriture sans œstrogènes jusqu'au 20 septembre 1961.

A cette date le groupe II reçoit 0,80 g par kilogramme de farine d'un mélange de stilbœstrol et hexanœstrol à parties égales.

Les deux groupes sont sacrifiés le 8 novembre 1961.

Observation clinique

A partir du 10 octobre apparaissent les premières différences entre les deux groupes :

Les poulets traités ont tendance à rester couchés, les pattes

sont repliées sur elles-mêmes. Dès le 25 octobre, ils ont des difficultés à marcher par suite d'une raideur musculaire très nette, les ailes sont écartées; mais ils continuent à manger normalement. La crête est inconsistante; le plumage est terne. Les animaux traités ont tendance à une diarrhée persistante mais non fétide.

Les témoins ont par contre une crête normale, et un plumage très coloré.

Constatations nécropsiques

Chez les poulets traités on observe une flaccidité musculaire ainsi qu'une pâleur des téguments que nous retrouverons toujours même avec de petites quantités d'œstrogènes.

— Le foie est blanc jaunâtre, petit, grumeleux.

— *Intestin* : malgré une diarrhée persistante, on ne remarque aucune congestion intestinale, ni aucune lésion d'entérite.

Poids des poulets témoins et expérimentés

On ne trouve aucune différence de poids entre les poulets traités et les témoins, ce qui est normal pour cette dose.

Pour cette série d'expérience, nous donnons à titre indicatif la moyenne des poids des poulets à des dates différentes.

Tableau XXXIV

Dates	Lots avec œstrogènes Cinq poulets	Lots sans œstrogène Cinq poulets
20-9	124 g	124 g
29-9	305 g	278 g
9-10	509 g	500 g
16-10	674 g	686 g
23-10	956 g	950 g
8-11	1 470 g	1 400 g

Nous notons dès le 29 septembre une augmentation de poids des animaux traités par rapport aux témoins, ce qui est dû à l'administration d'œstrogènes; mais dès le 16 octobre, les témoins se retrouvent à égalité de poids avec les traités, la croissance étant alors retardée par l'importance des quantités d'œstrogènes.

DEUXIÈME SÉRIE D'ESSAIS

Technique

Dix poussins mâles nés le 11 novembre 1961.

— Le groupe I sert de témoin.

— Le groupe II est traité avec 0,40 g/kg de farine d'un mélange à parties égales de stilbœstrol et hexanœstrol.

Nourriture

Au départ, les deux groupes reçoivent la même nourriture sans œstrogène. Le 21 novembre 1961, à l'âge de dix jours, le groupe II reçoit la nourriture supplémentée par l'œstrogène.

Les deux groupes sont sacrifiés le 19 janvier 1962.

Observation clinique

Après vingt jours de ce régime, le plumage est blanc, légèrement moucheté de noir; le maintien est celui d'une poulette; les animaux sont calmes, taciturnes; dénués de crête. Chez les témoins, le maintien est majestueux; le plumage est de plusieurs couleurs; la crête bien développée, l'instinct batailleur déjà très net.

Constatations nécropsiques

Chez les traités, les muscles sont d'une teinte bleue nacréée,

— le cœur est petit,

— les testicules sont atrophiés,

— la rate est très petite,

— poumons et autres viscères : normaux.

A titre d'exemple voici quelques poids de rates et de testicules.

	Normal	Traité
	—	—
Rate n° I	3,106 g	1,012 g
Rate n° II	3,085 g	1,168 g
Testicule n° I	0,695 g	0,363 g
Testicule n° II	0,680 g	0,400 g

Le foie est d'une couleur orangée, très friable.

Étude histologique

a) *La rate* :

Chez le témoin : Activité fonctionnelle normale où sont associés érythromyélopoïèse et lymphopoïèse.

Chez les traités : Importante hypoplasie des îlots d'érythromyélopoïèse, disparition de l'activité lymphoïde périarticulaire.

b) *Le foie* :

Chez le témoin : Activité fonctionnelle normale.

Chez le traité : Surcharge graisseuse microvacuolaire; mais la cellule hépatique ne manifeste aucun signe de souffrance.

Poids des poulets témoins et traités

Pour cette série d'expériences, nous donnons une moyenne du poids des poulets à des dates différentes de leur croissance :

Tableau XXXV
Moyenne des poids de poulets

Dates	Lot avec œstrogènes Cinq poulets	Lot témoin Cinq poulets
21-11-61	98 g	98 g
28-11-61	204 g	197 g
6-12-61	297 g	284 g
21-12-61	549 g	518 g
5-1-62	960 g	897 g
19-1-62	1 434 g	1 350 g

La quantité d'œstrogène introduite dans l'aliment, permet aux animaux traités de croître de façon plus importante que les témoins.

TROISIÈME SÉRIE D'ESSAIS

Technique

Nous utilisons dix poussins mâles nés le mardi 19 décembre 1961.

Le groupe I composé de cinq poulets est utilisé comme témoin.

Le groupe II composé de six poulets est traité avec 0,10 g/kg de farine d'un mélange à parties égales de stilbœstrol et d'hexanoœstrol.

Nourriture

Les deux groupes reçoivent au début la même nourriture exempte d'œstrogènes.

Le 4 janvier 1962, le groupe II reçoit de la farine additionnée d'œstrogènes.

Les deux groupes sont sacrifiés le mercredi 21 février 1962.

Observation clinique

La différence entre les traités et les témoins est importante :

Le plumage est encore terne par rapport au plumage brillant des témoins, la crête est toujours inexistante, l'instinct batailleur du jeune coq s'est aboli mais tardivement, environ quatre semaines après le traitement, le chant est supprimé.

Constatations nécropsiques

Chez les traités : les muscles sont d'une teinte blanc-nacrée, la rate est peu développée, le foie est de couleur orangée, les testicules sont atrophiés.

	Témoins	Traités
Rate n° I	2,993 g	1,982 g
Rate n° II	2,950 g	1,910 g
Testicule n° I	0,616 g	0,208 g
Testicule n° II	0,600 g	0,215 g

Étude histologique

Chez les traités :

a) Rate

Importante hypoplasie des îlots d'érythromyélopoïèse, disparition de l'activité lymphoïde périarticulaire, remplacement par des îlots lymphoblastiques nettement limités par une capsule.

b) Foie

La cellule hépatique est normale : en particulier le noyau a conservé sa forme, sa position et sa structure normales. Il ne s'agit donc pas de « dégénérescence ».

Par rapport à la couleur orangée du foie la quantité de graisse est faible; mais cette graisse est sous forme de micro-gouttelettes réparties dans tout le cytoplasme de la cellule de Remak; c'est ce qui explique la couleur caractéristique de l'organe.

Poids des poulets témoins et traités

Le traitement par les œstrogènes active de façon certaine le développement des jeunes coqs :

Tableau XXXVI

Date	N°	Poulets traités	N°	Témoins
4-1	1	190 g	1	180 g
	2	205 g	2	185 g
	3	210 g	3	190 g
	4	180 g	4	195 g
	5	180 g	5	200 g
	6	190 g		
	Moyenne	192 g	Moyenne	190 g
15-1	Moyenne	379 g	Moyenne	318 g
27-1	Moyenne	678 g	Moyenne	600 g
5-2	Moyenne	947 g	Moyenne	850 g
12-2	Moyenne	1 178 g	Moyenne	1 070 g
21-2	1	1 500 g	1	1 250 g
	2	1 420 g	2	1 320 g
	3	1 500 g	3	1 380 g
	4	1 500 g	4	1 250 g
	5	1 490 g	5	1 300 g
	6	1 550 g		
	Moyenne	1 493 g	Moyenne	1 300 g

Tableau XLI

Date	Moyenne poids poulets traités avec 0,90 mg/kg	Moyenne poids poulets traités avec 0,80 mg/kg	Moyenne poids poulets traités avec 0,70 mg/kg	Moyenne des témoins
27-4	228 g	250 g	220 g	228 g
28-4	traitement	traitement	traitement	traitement
5-5	300 g	315 g	295 g	293 g
15-5	504 g	520 g	498 g	445 g
22-5	760 g	805 g	740 g	683 g
6-6	1 160 g	1 162 g	1 186 g	963 g
20-6	1 600 g	1 682 g	1 670 g	1 350 g

Les œstrogènes synthétiques ont été ajoutés aux aliments à partir du 28 avril. L'efficacité des œstrogènes est apparue à la pesée du 22 mai, soit trois semaines environ après le début du traitement. Le poids entre les témoins et les traités est nettement différent à partir du 6 juin.

SIXIÈME SÉRIE D'ESSAIS

Technique

Cette dernière série d'essais est consacrée à des doses minimales d'œstrogènes ajoutées dans les aliments. Nous utilisons douze poussins mâles nés le 26 mai 1962. A l'âge de six semaines les jeunes coqs sont séparés en trois groupes.

Nourriture

Le groupe I, formé de quatre poulets recevra de la nourriture supplémentée avec 0,50 mg d'un mélange d'hexœstrol plus stilbœstrol par kilogramme de farine.

Le groupe II, composé de quatre poulets, sera nourri avec de la farine contenant 0,30 mg d'œstrogènes par kilogramme de farine.

Le groupe III, formé de quatre poulets, sera utilisé comme témoin.

Observation clinique

Aux doses très faibles d'œstrogènes, nous ne pouvons distinguer de véritables différences entre les traités et les témoins :

Tous les animaux ont l'aspect normal du jeune coq.

Constatations nécropsiques

Les muscles présentent, chez les animaux traités, une légère teinte blanchâtre. La graisse est toujours abondante.

Tous les organes sont normaux; mais le poids des testicules des coqs traités est inférieur à celui des témoins.

Poids des poulets témoins et traités

Nous obtenons un léger gain de poids chez les animaux traités.

CONCLUSION

De cette étude sur l'addition d'œstrogènes synthétiques dans les aliments nous pouvons dégager les points suivants :

1°) Régression des caractères sexuels secondaires très nette jusqu'à des doses de 0,70 mg d'œstrogènes par kilogramme d'aliments.

2°) Teinte blanc-nacrée des muscles très caractéristique aux doses importantes comme aux doses très faibles.

3°) Teneur en graisse importante.

4°) Diminution, dans tous les cas, du poids des testicules, par rapport aux séries témoins.

2) Œstrogènes naturels

A la suite de l'étude précédente, il nous a paru utile d'examiner, de façon succincte, les conséquences qui découlent de l'addition d'œstrogènes naturels dans la nourriture du jeune coq.

Technique

Nous utilisons trois groupes de jeunes coqs nés le 11 février 1963 :

— Le groupe I composé de quatre poulets est nourri avec de la farine additionnée de 1 mg d'œstradiol par kilogramme d'aliment.

— Le groupe II comprenant quatre poulets est nourri avec de la farine additionnée de 5 mg d'œstradiol par kilogramme d'aliment.

— Le groupe III, formé de quatre poulets, reçoit de l'aliment supplémenté par 10 mg d'œstradiol par kilogramme de farine.

— Le groupe IV, composé de quatre poulets, est utilisé comme témoin.

Nourriture

Tous les poussins mâles réunis au début ont reçu la même nourriture exempte d'œstrogène.

A partir du 5 mars, les groupes sont séparés et reçoivent chacun leur nourriture supplémentée par l'œstrogène naturel.

Le 18 mars, les poulets de tous les groupes sont pesés, sacrifiés et autopsiés.

Observation clinique

Il y a peu de signes de régression des caractères sexuels secondaires; seule la crête est peu développée par rapport aux témoins. Le chant apparaît très tardivement pour les coqs du groupe III.

Constatations nécropsiques

A l'autopsie, tous les organes sont normaux principalement le foie et la rate. Chez les traités, il existe une régression du poids des testicules; mais beaucoup moins importante que pour les poulets nourris avec des doses équivalentes d'œstrogènes synthétiques.

Nous rappelons, à titre de comparaison, le poids des testicules des poulets traités avec 1 mg et 10 mg d'œstrogènes synthétiques par kilogramme de nourriture.

Tableau XLII

Poulets	Groupe I 1 mg œstr. naturel	1 mg œstr. synthétique	Témoins
N° 1	0,525	0,450	0,630
N° 2	0,550	0,480	0,645

Tableau XLIII

Poulets	Groupe III 10 mg œstr. naturel	10 mg œstr. synthétique	Témoins
N° 1	0,490	0,402	0,630
N° 2	0,495	0,415	0,645

Par contre, nous n'avons pas retrouvé la teinte blanc-nacrée des muscles si caractéristique chez les poulets traités aux œstrogènes synthétiques. Enfin, il n'y avait pas de dépôt graisseux important.

Poids des poulets témoins et traités

Il semble que l'addition d'œstrogène naturel aux aliments n'ait pas une action aussi importante sur le poids des animaux que celle d'œstrogènes synthétiques. L'absence de dépôt graisseux en est probablement une des causes; mais nous avons constaté une augmentation de poids assez sensible dans le groupe III par rapport aux témoins.

QUATRIÈME SÉRIE D'ESSAIS

Technique

Nous utilisons douze poussins mâles, nés le 27 janvier 1962.

— Le groupe I, formé de cinq poussins, est traité avec 10 mg par kilogramme de farine d'un mélange à parties égales de stilbœstrol et hexanœstrol.

— Le groupe II, composé de quatre poussins est alimenté avec 1 mg par kilogramme de farine d'un mélange à parties égales de stilbœstrol et hexanœstrol.

— Le groupe III, sera utilisé comme *témoin*.

Nourriture

Tous les groupes reçoivent au début la même nourriture exempte d'œstrogènes.

Le 12 février, les groupes I et II reçoivent de la farine additionnée d'œstrogènes.

Tous les groupes sont sacrifiés à partir du 10 avril.

Observation clinique

Les signes de régression des caractères sexuels secondaires apparaissent plus tardivement, environ un mois après le début du traitement pour les poulets traités avec 10 mg par kilogramme et six semaines après pour ceux traités avec 1 mg par kilogramme.

Les principales observations sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau XXXVII

	Poulets nourris avec 0,01 g/kg	Poulets nourris avec 0,001 g/kg	Témoins
Plumage	Terne.	Coloré.	Brillant-coloré.
Crête	Inexistante, blan- châtre.	Petite, rouge.	Importante, rouge.
Maintien	Encore celui d'une poulette.	Normal du coq.	Normal.
Chant	Supprimé.	Supprimé.	Normal.
Instinct batail- leur	Supprimé.	Très légère appari- tion.	Développé.

A la lecture de ce tableau, nous remarquons qu'il existe encore quelques différences importantes entre un poulet témoin et un poulet traité avec des quantités d'œstrogènes s'élevant à 10 mg par kilogramme de farine; par contre, les poulets témoins et ceux traités avec 1 mg d'œstrogènes par kilogramme de farine sont dans l'ensemble identiques à l'exception de la hauteur de leurs crêtes et de l'abolition du chant.

Constatations nécropsiques

Chez les traités : il existe toujours une teinte blanc-nacrée des muscles.

La rate est normale dans les deux groupes des traités. Par contre, le foie est toujours de couleur jaunâtre, surtout dans le groupe I.

Les testicules sont atrophiés dans les deux groupes.

Voici, à titre d'exemple, le poids des testicules de deux poulets dans chaque groupe :

Tableau XXXVIII

N°	Groupe I	Groupe II	Groupe témoins
1	0,402 g	0,450 g	0,650 g
2	0,415 g	0,480 g	0,635 g

Étude histologique

- rate : activité fonctionnelle normale;
- foie : cellule hépatique normale.

Poids des poulets témoins et traités

Augmentation plus rapide des poulets traités par les œstrogènes.

Tableau XXXIX

Date	Moyenne des poids des 5 poulets traités avec 0,01 g/kg	Moyenne des poids des 4 poulets traités avec 0,001g/kg	Moyenne des poids des poulets témoins
12-2	190 g	222 g	221 g
28-2	438 g	461 g	400 g
20-3	932 g	985 g	860 g
2-4	1 290 g	1 260 g	1 000 g
15-4	1 550 g	1 700 g	1 380 g

CINQUIÈME SÉRIE D'ESSAIS

Technique

Dix-huit poussins mâles, nés le 10 avril 1962, ont été séparés en quatre groupes distincts :

— Le groupe I, comprenant cinq poussins, a été nourri avec de la farine contenant 0,90 mg d'œstrogènes synthétiques par kilogramme.

— Le groupe II, formé de quatre poussins, a été alimenté avec 0,80 mg d'œstrogènes par kilogramme de farine.

— Le groupe III, composé de cinq poussins, a reçu comme nourriture de la farine supplémentée avec 0,70 mg d'œstrogènes par kilogramme.

— Le groupe IV, avec quatre poussins, constitue le groupe témoin.

Nourriture

Tous les poussins mâles, au début réunis, ont reçu la même nourriture exempte d'œstrogène.

A partir du 20 juin, tous les poulets ont été pesés, sacrifiés et autopsiés.

Observation clinique

Il y a peu de régression des caractères sexuels secondaires : le plumage est de même couleur chez les traités et les témoins, le « maintien » des traités est identique aux témoins; mais, par contre, la hauteur de la crête est inférieure à celle des témoins. Le chant est supprimé pour les deux premiers groupes, quant aux poulets du groupe III, le chant apparaît vers la sixième semaine de traitement.

A partir de cette concentration en œstrogènes, nous distinguons difficilement des signes de régression des caractères sexuels secondaires; cette observation est très importante, car si le coq paraît normal, nous verrons, par contre, dans le chapitre consacré aux résultats, que sa chair renferme des restes non négligeables d'œstrogènes.

Constatations nécropsiques

Les muscles des animaux traités présentent toujours une teinte blanchâtre caractéristique, la graisse est encore abondante sur différentes parties du corps de l'animal.

La rate est normale.

Le foie est de couleur et de consistance normales.

Nous verrons, dans le chapitre des résultats, qu'il renferme des quantités d'œstrogènes non négligeables. Donc, le fait de se trouver en présence de foies apparemment normaux, ne doit pas empêcher la recherche de résidus œstrogéniques éventuels.

Le poids des testicules est inférieur au poids des témoins.

Tableau XL

Moyenne poids testicules Groupe I	Moyenne poids testicules Groupe II	Moyenne poids testicules Groupe III	Moyenne des témoins
0,633 g	0,569 g	0,584 g	0,700 g

Poids des poulets témoins et traités

Ici, encore, le poids des poulets traités aux œstrogènes est nettement plus important que celui des témoins :

un moyen de détection particulièrement sensible. Malheureusement, les carcasses sont souvent livrées sans les abats, il est donc nécessaire de pouvoir mettre en évidence ces résidus sur d'autres prélèvements.

L'expérience est rapide car en deux jours on peut affirmer que les poulets (ou autres volailles) expérimentés sont exempts d'œstrogènes synthétiques en utilisant seulement trois souris. Ce chiffre semble suffisant pour permettre de donner un résultat.

2) Le cou

a) Technique

Nous éliminons correctement les restes du « pellet » du cou de l'animal; nous conservons la graisse et la peau. Les boulettes sont préparées suivant la méthode précédemment décrite avec trois parties de viande pour une partie de farine.

Dix souris sont alimentées avec les boulettes de viande de poulets traités et dix souris servent de témoins.

b) Résultats

Les souris sont sacrifiées au deuxième jour du traitement. Les résultats sont les suivants :

Tableau XLV

Traités (utérus en mg)		T = 0 (utérus en mg)	
	36		10
	30		09
	41		10
	55		11
	52		09
	38		08
	42		08
	61		09
	34		09
	43		10
Moyenne :	43,2		9,3

c) *Discussion*

Les résultats démontrent une accumulation d'œstrogènes au niveau de la graisse et de la peau. Nous pouvons affirmer qu'il existe des quantités d'œstrogènes supérieures à 80 µg par kilogramme de viande.

3) **Viande**

a) *Technique*

Nous avons choisi des morceaux de viande provenant des différentes parties de l'animal et particulièrement des régions les plus éloignées de la zone de l'implant (surtout régions fémorales et coccygiennes).

Nous avons utilisé un lot de soixante-dix-sept souris femelles impubères que nous avons divisé en trois groupes.

— Un groupe de cinquante-sept souris servira au dépistage des restes œstrogéniques dans la viande.

— Un groupe de dix souris servant aux témoins (A).

— Un groupe de dix souris utilisé également pour témoins (B).

Le groupe n° I composé de cinquante-sept souris est divisé en douze groupes de quatre ou cinq souris employés à la recherche des œstrogènes dans la viande de douze poulets.

Les souris sont nourries avec des boulettes formées de trois parties de viande, pour une partie de farine. Chaque sous-groupe de quatre ou cinq souris reçoit quatre ou cinq « boulettes » séchées.

b) *Résultats*

Ils sont indiqués dans le tableau suivant. Nous notons que les souris sont sacrifiées au deuxième jour du traitement.

Tableau XLVI

N° du poulet	Nombre de souris	Poids utérus en mg	Moyenne
I	4	27 — 24 16 — 17	21
II	5	33 — 28 — 22 24 — 30	27,8
III	4	18 — 23 24 — 19	21
IV	5	19 — 19 — 29 29 — 24	24
V	5	19 — 20 — 18 19 — 20	19,2
VI	5	18 — 19 — 20 20 — 19	19,2
VII	5	27 — 16 — 17 24 — 33	23,4
VIII	5	33 — 26 — 20 24 — 21	24,8
IX	5	23 — 18 — 22 22 — 21	21,2
X	4	19 — 21 19 — 18	19,2
XI	5	16 — 20 — 18 22 — 25	20,2
XII	5	21 — 20 — 20 17 — 19	19,4

Les deux groupes de témoins donnent les résultats suivants :

Tableau XLVII

	Groupe A	Groupe B
Moyenne poids utérus en mg	10 mg	9,1 mg

Il existe donc des restes œstrogéniques très facilement déce-

lables dans la viande de poulet (à l'exclusion du foie et du cou) traitée par la méthode classique de l'insertion d'un comprimé synthétique dans le derme. Les quantités d'œstrogène sont moins importantes que dans le foie, mais on peut dire qu'on en retrouve de 10 à 30 μg par kilogramme de viande.

CONCLUSION

Par cette méthode, nous pouvons, en quarante-huit heures, faire connaître qu'un lot de poulets a reçu des œstrogènes synthétiques par castration chimique, soit par prélèvement du foie de la graisse et de la peau du cou avec un petit nombre de souris, soit par la viande de poulets elle-même en choisissant les parties les plus éloignées de la zone de l'implant.

Il est donc, dans ce cas précis, très difficile de laisser échapper une infraction au décret du 20 mars 1959.

2) Comprimés d'œstrogènes naturels

Les poulets sont sacrifiés cinq semaines après l'insertion des comprimés.

Nous conservons séparément pour chaque poulet :

- a) le foie,
- b) la tête et le cou,
- c) la viande désossée.

1) Le foie

a) *Technique*

Les foies des poulets numérotés de un à six pour les traités et de neuf à douze pour les témoins sont présentés sous forme de biscuits séchés de sept grammes, et distribués à des groupes de trois souris.

De même nous avons sacrifié les poulets n^{os} 7 et 8 traités avec des œstrogènes synthétiques.

b) *Résultats*

Les souris sont sacrifiées après avoir été nourries pendant quarante-huit heures avec des boulettes de foies.

Conclusion

De cette étude sur l'addition d'œstrogènes naturels nous pouvons observer :

- Diminution du poids des testicules.
- Pas de régression sensible des caractères sexuels secondaires (excepté pour la crête).
- Teneur en graisse peu importante.

C. — CONCLUSION

D'après cette étude, nous avons constaté que l'examen macroscopique et microscopique permettait de réunir certaines « présomptions » concernant l'addition éventuelle d'œstrogènes. Il est donc important, avant de procéder à une recherche systématique des œstrogènes sur divers organes et viandes, de constater minutieusement l'état de la volaille, et tout particulièrement son foie, sa rate, et la coloration de ses muscles. De plus, l'étude des testicules des poulets traités permet de constater une diminution importante de leurs poids par rapport aux testicules des poulets témoins.

TROISIÈME PARTIE

RECHERCHE DES ŒSTROGÈNES DANS LES CARCASSES

Ce chapitre de notre étude sera consacré à la recherche des œstrogènes synthétiques et naturels administrés au cours de l'élevage des poulets traités soit par insertion de pellets dans le derme du cou, soit par addition d'œstrogènes dans les aliments. Nous étudierons successivement les résidus œstrogéniques dans le foie, le cou, la graisse et la viande de ces poulets.

A. — POULETS TRAITÉS PAR INSERTION DE COMPRIMÉS DANS LE DERME

1) Comprimés d'œstrogènes synthétiques

Cinq semaines après l'insertion du « comprimé », les poulets sont sacrifiés.

Nous conservons pour chaque poulet :

- a) le foie,
- b) la tête et le cou,
- c) la viande désossée.

1) Le foie

a) *Technique*

Les foies de chaque poulet numérotés de un à douze pour les traités et de treize à dix-huit pour les témoins sont hachés sépa-

rément et présentés sous forme de « boulettes » (foie et farine à parties égales) séchées à l'étuve.

Ces boulettes sont distribuées à des groupes de trois souris par foie de poulets.

b) *Résultats :*

Ils sont indiqués dans le tableau suivant :

Tableau XLIV

Poulets traités	N° 1	N° 2	N° 3	N° 4	N° 5	N° 6
Utérus	25	25	19	30	37	29
Souris/mg	20	20	38	32	23	25
	18	36	21	22	18	24
Moyenne	21	27	26	28	26	26
Poulets traités	N° 7	N° 8	N° 9	N° 10	N° 11	N° 12
Utérus	27	49	62	38	21	40
Souris/mg	29	51	38	41	36	21
	32	65	21	18	38	21
Moyenne	29,3	51,6	40,3	32,3	31,6	27,3
Poulets témoins	N° 13	N° 14	N° 15	N° 16	N° 17	N° 18
	09	10	08	09	08	09
	08	07	09	10	09	09
	09	09	09	08	09	09
Moyenne	8,6	8,6	8,6	9	8,6	9

CONCLUSION

Nous pouvons affirmer qu'il existe des restes œstrogéniques dans des proportions très importantes qui dépassent 80 µg/kg de foie. Les résultats sont probants : les œstrogènes de synthèse introduits sous forme de « comprimés » sont stockés en grande quantité au niveau du foie. De ce fait cet organe apparaît comme

Tableau XLVIII

Poulets traités œstr. nat.	Œstrogènes naturels						Œstr. synthétiques	
	N° 1	N° 2	N° 3	N° 4	N° 5	N° 6	N° 7	N° 8
Utérus sou- ris/mg	18 14 13	20 13 14	13 20 12	20 14 14	15 14 18	20 12 13	24 39 18	28 30 33
Moyenne ..	15	15,6	15	16	15,6	15	27	30,3

Poulets témoins	N° 9	N° 10	N° 11	N° 12
Utérus souris/mg	10 08 09	09 10 10	10 09 09	09 09 09
Moyenne	09	9,6	9,3	09

CONCLUSION

Nous pouvons assurer qu'il existe des traces œstrogéniques naturelles dans la proportion de 10 à 25 µg par kilogramme de foie, facilement décelable par notre méthode.

Le foie, organe facilement et rapidement prélevable sur l'animal, peut être utilisé comme moyen de détection pour retrouver une addition *abusive* d'œstrogènes naturels ou synthétiques.

2) Le cou

a) Technique

Les restes de pellets sont éliminés du cou de l'animal, et avec la graisse et la peau de cette région, nous préparons des boulettes suivant notre méthode habituelle.

Dix souris sont nourries avec des boulettes de viande et dix souris serviront de témoins.

b) Résultats

Les souris sont sacrifiées au deuxième jour du traitement. Les résultats sont consignés dans le tableau suivant :

Tableau XLIX

Traités (utérus en mg)	T = 0 (utérus en mg)
16	08
18	09
17	09
15	10
16	10
17	09
16	08
18	10
17	10
16	09
Moyenne : 16,6	9,2

Comme nous l'avions déjà prouvé pour les œstrogènes synthétiques, il y a une accumulation d'œstrogènes au niveau de la graisse et de la peau. Les quantités d'œstrogènes sont de l'ordre de 20 µg par kilogramme de viande.

3) La viande

a) Technique

Nous avons choisi des portions de viandes provenant des parties les plus éloignées de la zone de l'implant.

Nous avons utilisé un lot de soixante-quatre souris femelles impubères que nous divisons en deux groupes.

Le groupe I de quarante-quatre souris est utilisé pour dépister les restes œstrogéniques.

— Le groupe II de vingt souris est utilisé comme témoin.

Le groupe I est divisé en six sous-groupes correspondant aux six poulets à étudier. La nourriture que nous fournissons aux souris impubères est présentée sous la forme habituelle de boulettes séchées.

Le groupe II est nourri avec des boulettes de viande provenant de poulets témoins.

b) Résultats

Les souris sont sacrifiées après quarante-huit heures de traitement. Les résultats sont indiqués dans le tableau suivant :

Tableau L

N° du poulet	Nombre de souris	Poids utérus en mg	Moyenne
1	9	11 — 17 — 14 21 — 12 — 15 18 — 18 — 18	16
2	7	14 — 18 — 10 10 — 14 14 — 14	13,4
3	7	16 — 12 — 15 18 — 16 10 — 14	14,4
4	7	10 — 14 — 11 11 — 13 14 — 14	12,4
5	7	14 — 11 — 11 12 — 14 12 — 14	12,5
6	7	18 — 11 — 15 15 — 15 14 — 15	14,7

Les poulets n°s 7 et 8 qui avaient reçu des comprimés d'œstrogènes synthétiques, et qui permettent ainsi de comparer les résultats avec les œstrogènes naturels donnent les résultats suivants :

Poulet n° 7 : Moyenne des poids d'utérus de sept souris : 21,8 mg

Poulet n° 8 : Moyenne des poids d'utérus de sept souris : 24,3 mg

Pour le groupe témoin comprenant vingt souris, nous avons obtenu une moyenne des poids d'utérus s'élevant à 10 mg.

Les résidus œstrogéniques s'élèvent pour les poulets traités par des comprimés d'œstrogènes naturels à des doses ne dépassant par 15 μ g par kilogramme de viande.

CONCLUSION

Nous pouvons affirmer que les poulets traités avec des comprimés d'œstrogènes naturels ou synthétiques sont très facilement décelables soit par la méthode à l'aide des foies ou de la graisse des volailles, soit par la méthode plus lente de la viande de poulets elle-même. Nous obtenons des résultats satisfaisants en nourrissant les souris pendant deux jours.

B. — POULETS TRAITÉS PAR ADDITION D'ŒSTROGÈNES DANS LES ALIMENTS

1) Œstrogènes synthétiques

PREMIÈRE ET DEUXIÈME SÉRIES D'ESSAIS

a) *Technique*

Nous avons utilisé pour ces deux premières séries des doses d'œstrogènes synthétiques de 0,80 g et 0,40 g par kilogramme d'aliments.

Les poulets une fois sacrifiés, sont désossés et la viande passée au hachoir. Des « boulettes » sont confectionnées avec de la farine spéciale pour souris. Nous obtenons des « biscuits » de consistance un peu molle dont les souris sont friandes.

Chaque souris impubère, placée séparément dans un bocal est nourrie avec un biscuit pesant environ sept grammes après passage à l'étuve, pendant sept jours. Le huitième jour, les souris sont sacrifiées.

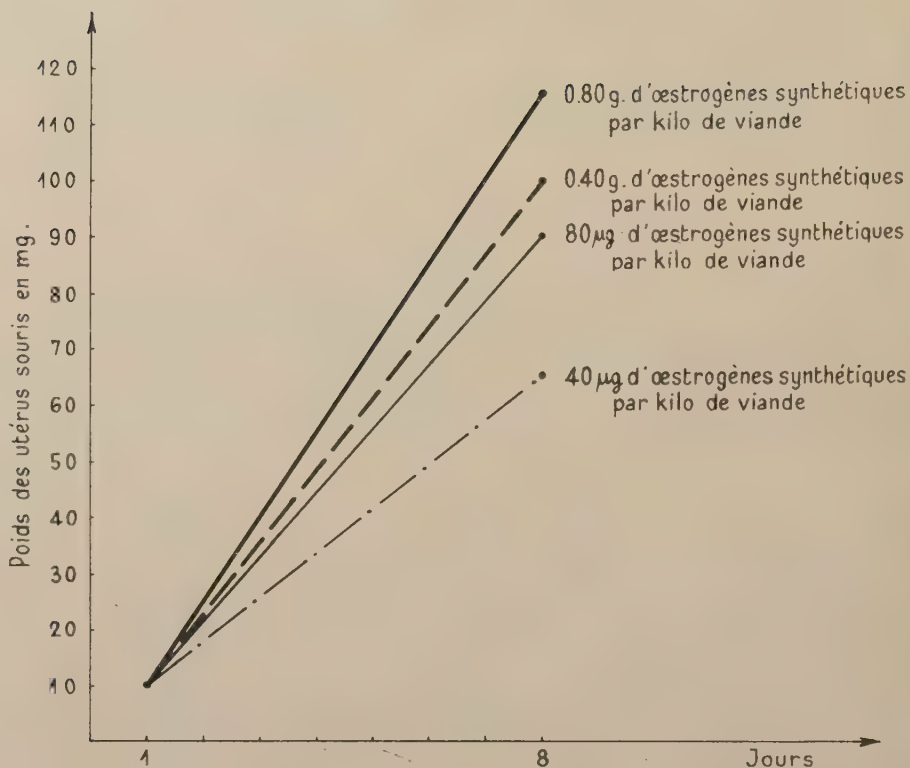
b) Résultats

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant, indiquant les poids des utérus des souris en milligrammes :

Tableau LI

Poids utérus souris en mg		
T = 0	I = 0,80 g/kg	II = 0,40 g/kg
15	116	124
15	91	105
20	164	90
14	89	108
13	166	70
18	114	85
18	123	100
11	131	106
17	137	93
20	125	77
19	131	97
15	119	107
20	85	101
18	94	112
17	104	94
13	97	112
22	98	101
21	68	98
16	155	125
15	132	95
Moyenne : 17	115	100

A l'aide des courbes montrant la variation de la moyenne des poids d'utérus de souris nourries pendant huit jours respectivement avec 80 μ g et 40 μ g d'œstrogènes synthétiques par kilogramme de viande, nous comparons les résultats obtenus : les poulets nourris avec 0,80 g par kilogramme d'aliments renferment des quantités très supérieures à 80 μ g par kilogramme et les poulets nourris avec 0,40 g par kilogramme renferment des quantités d'œstrogènes légèrement supérieures à 80 μ g par kilogramme.



TROISIÈME SÉRIE D'ESSAIS

Nous avons utilisé pour l'alimentation des poulets une quantité d'œstrogènes égale à 0,10 g par kilogramme d'aliments. Pour détecter les résidus œstrogéniques, nous employons séparément le foie et la viande des poulets.

1) Les foies

a) Technique

Les foies des poulets sont séparés, passés très finement au

hachoir et on ajoute une quantité égale de farine spéciale pour souris. Les boulettes sont séchées à l'étuve à 100° pendant trente minutes. Nous formons un lot de cinq souris femelles impubères placées séparément qui, pendant sept jours, recevront chacune trois boulettes séchées de sept grammes, soit une boulette tous les deux jours pour chaque souris.

b) Résultats

Nous notons le poids de l'utérus de souris en milligrammes ainsi que le poids des souris au début et à la fin du traitement.

Tableau LII

N° de la souris traitée	Poids début traitement	Poids fin traitement	Poids utérus en mg
1	10 g	16 g	80
2	9,5 g	16,5 g	82
3	10 g	17 g	85
4	9,5 g	17,5 g	73
5	10 g	16 g	88
Moyenne	9,8 g	16,6 g	81,6

Tableau LIII

N° de la souris témoin	Poids premier jour	Poids huitième jour	Poids utérus mg
1	10,5 g	17 g	15
2	10 g	16 g	19
3	10 g	15,5 g	17
4	10 g	17 g	20
5	10,5 g	16,5 g	21
Moyenne	10,2 g	16,4 g	18,4

Les souris traitées et témoins se développent normalement. L'addition d'œstrogènes ne gêne nullement la croissance des souris, soit un gramme environ par jour. Celle-ci n'est pas non plus perturbée par les petites quantités de nourriture fournie (un biscuit de 6,5 g à 7 g tous les deux jours).

Pour un poulet nourri avec 0,10 g d'œstrogènes par kilogramme d'aliments, nous trouvons, dans le foie, des résidus œstrogéniques équivalent à un peu moins de 80 μ g d'œstrogènes par kilogramme.

2) La viande

a) Technique

Un lot de quinze souris femelles impubères est nourri pendant sept jours avec des biscuits de viande, à raison d'un biscuit par jour. Nous utilisons également un deuxième lot de quinze souris comme témoins.

b) Résultats

Le huitième jour, les souris sont sacrifiées :

Tableau LIV

Poids de l'utérus souris en mg	
T = 0	T = 0,100 g/kg d'aliments
17	120
16	138
18	120
18	102
16	91
17	109
16	92
17	107
17	112
16	128
19	110
18	129
18	131
19	118
20	116
Moyenne :	114

Lorsque la viande renferme des quantités relativement importantes d'œstrogènes, l'utérus des souris réagit violemment avec kératinisation au niveau de la jonction utéro-vaginale. Nous obtenons alors des poids très importants d'utérus, c'est le cas pour des viandes renfermant des quantités d'œstrogènes supérieures à 40 µg par kilogramme.

QUATRIÈME SÉRIE D'ESSAIS

Deux lots de jeunes coqs ont été traités avec des aliments contenant respectivement 0,01 g et 0,001 g d'œstrogènes synthétiques par kilogramme.

1) Les foies

a) Technique

Nous avons utilisé deux lots de cinq, un lot étant utilisé comme témoin. Chaque souris placée séparément a reçu un biscuit tous les deux jours pendant sept jours. Nous avons opéré de même avec les foies des poulets témoins.

Le huitième jour, les souris ont été sacrifiées; les utérus prélevés et pesés.

b) Résultats

Ils sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau LV

Poids des utérus en milligrammes		
Groupe I 0,01 g œstrog. par kg	Groupe II 0,001 g œstrogènes par kg	Groupe témoin
86	32	16
106	46	16
83	50	17
100	40	20
52	29	20
Moyenne : 85,4	39,4	17,6

Le groupe témoin et le groupe II sont très homogènes; par contre le groupe I l'est beaucoup moins, en effet, lorsque le foie ou la viande renferme des doses importantes d'œstrogènes, la réaction utérine est plus ou moins affirmée, le vagin se kératinise plus ou moins fortement, et nous obtenons des variations importantes des poids d'utérus. C'était le cas pour les lots précédents et c'est ce qui se produit pour le groupe I où nous obtenons des écarts de poids de cinquante-quatre milligrammes.

Pour le groupe I, nous trouvons, dans le foie, des résidus œstrogéniques équivalents à 80 μ g d'œstrogènes par kilogramme, et pour le groupe II, à 30 μ g d'œstrogènes par kilogramme.

2) La viande

a) Technique

La viande est transformée en boulettes de 9 g séchées à l'étuve à 100° pendant trente minutes.

Nous utilisons trois lots égaux de souris :

— Un lot de quinze souris pour la recherche des résidus œstrogéniques dans la viande des poulets nourris avec 0,01 g par kilogramme d'aliment.

— Un lot de quinze souris pour la recherche des œstrogènes dans la viande de poulets nourris avec 0,001 g par kilogramme d'aliment.

— Un lot de quinze souris témoins.

Chaque souris, placée dans des bocalx individuels, reçoit quotidiennement un « biscuit ».

Les souris sont nourries ainsi pendant sept jours; le huitième jour toutes les souris sont sacrifiées, y compris les témoins.

b) *Résultats*

Tableau LVI

Poids des utérus en mg		
Lot n° 1 0,01 g/kg	Lot n° 2 0,001 g/kg	Lot témoin
41	33	15
36	37	14
39	36	18
42	36	20
38	43	12
39	35	11
39	40	14
39	42	10
39	36	10
42	45	11
43	41	11
48	35	11
40	38	10
47	35	10
48	38	15
Moyenne: 41,3	38	12,8

Chacun des lots est homogène. Pour le lot n° 1 il existe une variation de douze milligrammes entre l'utérus le plus lourd et l'utérus le plus léger, et une variation de dix milligrammes pour le lot n° 2.

Lorsque les doses d'œstrogènes contenues dans la viande sont inférieures ou égales à 40 µg, l'utérus de la souris réagit moins fortement, il n'y a pas de kératinisation vaginale ni de vascularisation, ni surtout d'accumulation de liquide, ce qui permet d'obtenir des résultats plus homogènes.

Ces viandes renferment des résidus œstrogéniques équivalents à 30 µg par kilogramme de viande.

CINQUIÈME SÉRIE D'ESSAIS

Trois lots de jeunes coqs ont été nourris avec des farines contenant respectivement 0,90 mg, 0,80 mg, 0,70 mg d'œstrogènes synthétiques par kilogramme d'aliments.

1) Les foies

a) *Technique*

Notre méthode est différente de celle utilisée précédemment. Les souris sont sacrifiées au deuxième jour du traitement ce qui permet d'utiliser un plus grand nombre de souris pour la même quantité de foie; en effet, un lot de quatre souris est placé ensemble dans un bocal et reçoit un biscuit par jour et par souris, soit deux biscuits en tout pour la durée du traitement pour chaque souris.

Le foie de chaque poulet est passé finement au hachoir, nous ajoutons un poids égal de farine pour souris afin d'obtenir une masse homogène.

Un foie de poulet pèse environ trent-cinq grammes; on ajoute trente-cinq grammes de farine, ce qui permet d'obtenir huit boulettes d'environ neuf grammes à l'état frais. Nous pouvons ainsi utiliser quatre souris pour chaque foie.

Nous divisons les souris en quatre lots :

— Un lot pour détecter les résidus d'œstrogènes se trouvant dans les foies de poulets traités par 0,90 mg d'œstrogènes par kilogramme d'aliment.

— Un deuxième lot pour les foies de poulets traités avec 0,80 mg par kilogramme d'aliment.

— Un troisième lot pour les poulets traités avec 0,70 mg par kilogramme d'aliment.

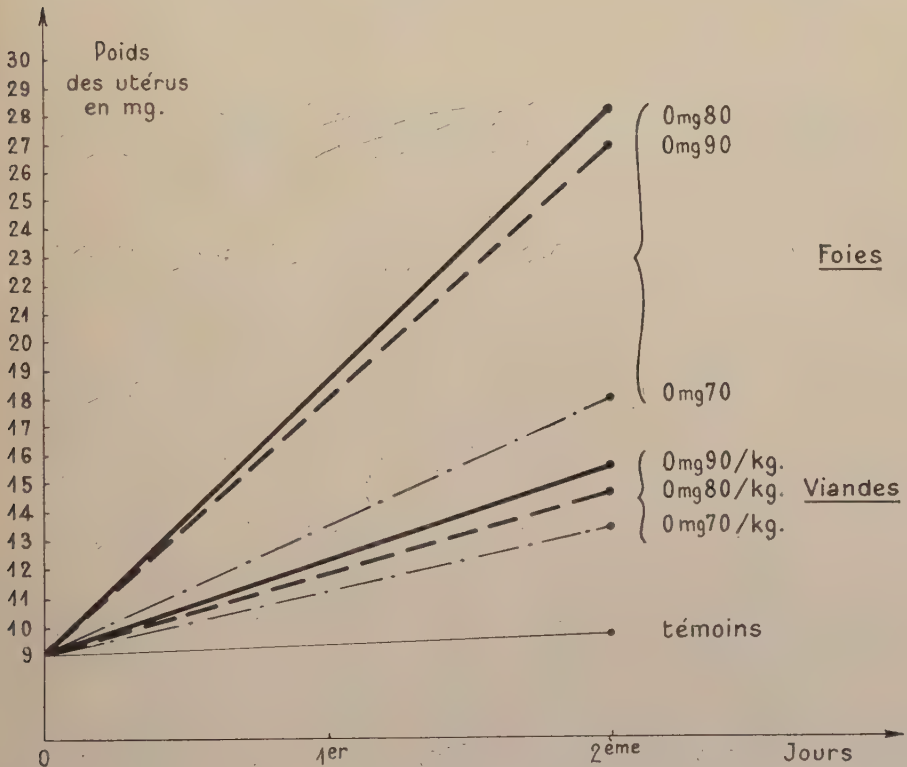
— Un lot témoin.

b) *Résultats*

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant : Les poids des utérus des souris sont donnés en milligrammes; chaque résultat représente les moyennes des poids de quatre utérus de souris.

Tableau LVII

N° poulet	Nombre de souris	T = 0	Deuxième jour		
			A = 0,9 mg par kg	B = 0,80 mg par kg	C = 0,70 mg par kg
1	4	8	25	26	17
2	4	9	26	28	17
3	4	10	28	29	18
4	4	11	29	30	20
Moy. G...		9,5	27	28	18



Les résultats sont très satisfaisants. Chaque groupe de résultat est très homogène. Nous pouvons facilement apporter la preuve qu'un poulet a été nourri avec une farine comprenant

0,7 mg d'œstrogènes synthétiques (stilbœstrol + hexanœstrol) par kilogramme de ration uniquement en prélevant son foie. Nous pouvons donner le résultat dans les quarante-huit heures, ce qui semble très raisonnable comme délai pour une épreuve biologique.

2) La viande

a) Technique

Les souris sont également sacrifiées au deuxième jour du traitement; nous utilisons une quantité moins importante de viandes; nous faisons un prélèvement de viande sur différentes parties de l'animal, et principalement au niveau où la graisse s'est accumulée.

b) Résultats

Nous avons employé quatre groupes de quinze souris impubères, un des groupes étant nourri avec la viande de poulets témoins. Les poids des utérus sont donnés en milligrammes.

Tableau LVIII

48 heures — Utérus en mg			
T = 0	A = 0,90 mg par kg	B = 0,80 mg par kg	C = 0,70 mg par kg
08	21	12	19
10	18	16	17
07	20	17	12
12	22	16	12
12	15	16	11
07	16	14	19
09	14	13	13
10	14	17	12
12	12	16	11
11	12	11	11
12	15	11	12
09	14	11	14
09	13	17	14
10	14	18	17
11	14	14	10
Moyenne : 9,9	15,6	14,6	13,6

Sur le graphique, nous avons noté les moyennes des poids d'utérus de souris concernant le foie et la viande des poulets traités. Lorsque les doses d'œstrogènes synthétiques utilisées sont très faibles, nous voyons que les résultats donnés par les foies sont beaucoup plus nets que ceux donnés par la viande. Nous avons une concentration plus importante au niveau du foie qu'au niveau des masses musculaires de la volaille. Pour la viande, tous les lots sont significativement différents entre eux, mais il est utile d'employer un minimum de quinze souris par lot, afin d'obtenir des résultats valables qui ne soient pas sujets à discussion.

SIXIÈME SÉRIE D'ESSAIS

Deux lots de jeunes coqs ont été nourris avec des farines contenant respectivement 0,50 mg et 0,30 mg d'œstrogènes synthétiques par kilogramme d'aliment.

1) Les foies

a) *Technique*

Nous employons la même technique que précédemment :

- Quatre souris par foie.
- Souris placées ensemble.
- Souris sacrifiées au deuxième jour.
- Les boulettes de foie séchées à l'étuve à 100° trente minutes.
- Un biscuit par souris et par jour.

b) *Résultats*

Nous utilisons trois lots de seize souris. Les poids d'utérus sont donnés en milligrammes. Tous les résultats sont exprimés dans le tableau suivant :

Tableau LIX

Poids moyen des utérus en milligrammes

N° du poulet	Nombre de souris	T = 0	A = 0,50 mg par kg	B = 0,30 mg par kg
1	4	11	31	28
2	4	08	26	28
3	4	09	30	25
4	4	09	29	27
Moyenne générale		09	29	27

On peut mettre définitivement en évidence la présence de résidus œstrogéniques provenant de poulets nourris avec des doses d'œstrogènes de 0,50 mg et 0,30 mg par kilogramme d'aliments; ce qui est une dose limite pour obtenir des résultats positifs sur les poulets, comme nous l'avons montré dans le chapitre précédent.

2) La viande

à) Technique

Nous avons utilisé deux lots de quinze souris qui seront nourries avec des biscuits provenant respectivement de la viande de poulets nourris avec 0,50 mg et 0,30 mg. Les souris femelles impubères ont reçu un biscuit par jour et par souris. Un troisième lot est utilisé comme témoin.

Toutes les souris sont sacrifiées au deuxième jour du traitement.

b) *Résultats*

Les poids des utérus sont donnés en milligrammes.

Tableau LX

48 heures — Nombre de souris : 15

T = 0	A = 0,50 mg par kg	B = 0,30 mg par kg
08	10	23
09	12	14
08	15	13
07	13	13
08	15	10
10	16	08
09	14	11
08	13	16
07	16	10
10	10	11
09	11	14
10	17	08
08	09	11
09	10	12
09	13	12
Moyenne: 8,6	12,9	12,4

Aux doses employées, nous pouvons encore affirmer qu'il existe des résidus œstrogéniques dans la viande; mais nous touchons à la limite de la sensibilité de la méthode, car une moyenne des poids d'utérus inférieure à 12 mg ne doit plus être considérée comme une réaction positive.

CONCLUSION

Cette étude a permis de rechercher par l'épreuve de l'utérus de souris des résidus œstrogéniques chez des poulets qui sont nourris avec de la farine additionnée d'œstrogènes synthétiques. Pour des doses d'œstrogènes s'étendant de 0,80 g par kilogramme à 0,01 g par kilogramme, les résultats sont très satisfaisants mais lorsque les souris sont traitées pendant sept jours il y a des variations importantes des poids des utérus de souris dues à l'accumulation de liquide et à un début de kératinisation des organes sexuels.

Nous pouvons apporter la preuve en deux jours qu'un foie

ou une viande provient d'un poulet qui a été nourri avec une farine comprenant au moins 0,30 mg d'œstrogènes synthétiques par kilogramme de ration. Il faut noter que cela n'est pas absolument vrai. En effet, les poulets ont tendance à gâcher leur nourriture et à choisir les parties granuleuses (maïs, etc.) et à négliger les parties farineuses où a été placé l'œstrogène.

2) Œstrogènes naturels

Trois lots de jeunes coqs ont été nourris avec des farines additionnées respectivement de 0,01 g, 0,05 g et 0,001 g d'œstrogènes naturels (œstradiol). En effet, dans ce cas nous n'étions pas obligé d'employer des pellets stériles, ce qui nous a permis d'utiliser l'hormone pure.

1) Les foies

a) Technique

Chaque foie est traité séparément : on le passe finement au hachoir et on ajoute une quantité égale de farine pour souris. Les biscuits obtenus sont distribués à quatre souris femelles impubères pendant deux jours.

Nous utilisons quatre lots de seize souris femelles qui sont sacrifiées après deux jours de traitement.

b) Résultats

Nous avons résumé tous les résultats dans le tableau suivant; chaque résultat représente la moyenne des poids de quatre utérus de souris :

Tableau LXI
Poids moyen des utérus en mg

N° du poulet	Nombre de souris	T = 0	A = 0,01 g par kg	B = 0,05 g par kg	C = 0,001 g par kg
1	4	10	15	13,5	11,5
2	4	09	16	14	12
3	4	09	14	18	12
4	4	10	15	12	14
Moyenne générale		9,5	15	14,4	12,3

Nous apportons la preuve que des poulets nourris avec des œstrogènes naturels (œstradiol) soient facilement décelables par notre méthode; le foie renferme des résidus œstrogéniques, surtout pour les poulets nourris avec 0,01 g et 0,05 g par kilogramme de ration; il semble que la sensibilité de la méthode soit au moins de 0,001 g d'œstrogène dans un kilogramme d'aliment pour poulet.

2) La viande

a) Technique

Nous avons utilisé trois lots de quinze souris impubères qui reçoivent des biscuits provenant de la viande de poulets nourris respectivement avec 0,01 g, 0,05 g et 0,001 g d'œstrogènes naturels par kilogramme de farine. Un quatrième lot a servi de témoin. Tous les lots ont été sacrifiés au deuxième jour du traitement.

b) Résultats

Tableau LXII

48 heures — Poids utérus en mg

T = 0	A = 0,01 g par kg	B = 0,05 g par kg	C = 0,001 g par kg
08	25	14	13
10	14	14	13
10	14	14	16
11	16	12	15
07	15	25	15
07	13	19	12
08	13	17	17
07	16	14	10
09	17	12	15
09	16	11	16
10	15	12	15
09	15	18	18
10	18	16	13
08	16	15	14
08	15	16	14
Moyenne: 8,7	15,2	15,2	14,4

On peut donc dépister chez les poulets des œstrogènes naturels par l'augmentation de poids de l'utérus de souris en quarante-huit heures. La sensibilité de la méthode est au moins de

1 mg d'œstrogènes dans un kilogramme d'aliment pour poulets. Aux petites doses, si les résidus d'œstrogènes synthétiques s'accumulent surtout dans le foie et en plus petite quantité dans la viande, il semble que pour les œstrogènes naturels il y ait une accumulation uniforme au niveau du foie et de la viande, ce qui revient à dire que le foie concentre moins et la diffusion est plus faible dans la masse musculaire.

CONCLUSION

Nous apportons la preuve en quarante-huit heures qu'un foie ou une viande provient d'un poulet qui a été nourri avec une farine comprenant au moins 1 mg d'œstrogènes naturels par kilogramme de ration. La sensibilité de la méthode est faible par rapport aux œstrogènes synthétiques (0,30 mg par kilogramme), mais pour obtenir des résultats convenables chez les poulets, il paraît nécessaire d'employer au moins 1 mg d'œstrogènes naturels par kilogramme de ration.

QUATRIÈME PARTIE

APPLICATION DE LA MÉTHODE A UNE EXPERTISE

Au mois de juin 1963, des poulets nous ont été adressés pour expertise :

A la suite d'accidents survenus dans une famille du Nord de la France, nous avons reçu des prélèvements de foies et de poulets provenant de différentes origines, afin de dépister s'il n'y avait pas eu addition d'œstrogènes dans les aliments ou traitement chimique des poulets, interdits par le décret du 20 mars 1959.

Cette expertise nous a permis de codifier le prélèvement.

1) PRÉLÈVEMENT

a) Les foies

Dans un groupe de poulets, on doit prélever rapidement les foies. On les place séparément dans des petits sacs en matière plastique fermés hermétiquement et scellés. Les sacs doivent être portés rapidement dans un appareil frigorifique à -20° pour éviter toute lyse des organes. Chaque sac doit être accompagné d'une fiche signalant l'heure, la date et l'origine du prélèvement ainsi que le poids du poulet.

b) Les poulets

Le poulet entier ou une partie du poulet seulement est mis dans un sac en matière plastique et porté rapidement dans un appareil frigorifique à -20° . Chaque sac doit également être accompagné d'une fiche indiquant l'heure, la date et l'origine du prélèvement.

Dans tous les cas, les prélèvements doivent être envoyés dans le plus bref délai au laboratoire.

2) ÉTUDE SYSTÉMATIQUE DES PRÉLÈVEMENTS

Étude A

Nous avons reçu trois sacs en matière plastique contenant uniquement des foies de poulets provenant de trois origines différentes :

a) *Aspect*

— Foies rouges bruns, de poids normal.

b) *Technique*

— Les foies de chaque origine sont hachés avec poids égal de farine afin de préparer des biscuits de neuf grammes qui sont passés à l'étuve pendant trente minutes à 100°.

Nous utilisons vingt-quatre souris femelles impubères, âgées de vingt-et-un jours qui reçoivent pendant deux jours les biscuits ainsi préparés.

Les souris sont alors sacrifiées, les utérus prélevés et pesés.

c) *Résultats*

Tableau LXIII

Poids des utérus en mg		
Foies des poulets provenant de l'élevage X...	Foies de poulets provenant de l'élevage Y...	Foies de poulets provenant de l'élevage Z...
12	10	12
10	10	10
09	10	12
11	10	09
08	11	09
10	10	09
08	11	09
09	11	09
Moyenne : 9,6 mg	10,3 mg	9,8 mg

d) *Conclusion*

— Le poids moyen des utérus normaux au deuxième jour, oscille entre 8,5 et 11 mg : donc absence d'œstrogène dans les trois lots de foies.

Étude B

Nous avons reçu également quatre poulets provenant de quatre origines différentes et emballés séparément dans des sacs en matière plastique.

Dès leur arrivée au laboratoire, les poulets à étudier sont mis rapidement à dégeler (ces derniers ayant été conservés au réfrigérateur à -20°); le foie de chaque poulet est immédiatement prélevé afin d'être étudié séparément.

a) **Foie**

1) *Aspect*

— Foies des poulets provenant de l'élevage A, C, D : foies rouges-bruns, normaux, pesant environ 30, 35 g.

— Foie du poulet provenant de l'élevage B : foie jaunâtre, « grassex », friable pesant 35 g environ.

2) *Technique*

Le foie des quatre poulets est haché séparément et additionné de farine afin d'obtenir des boulettes préparées suivant notre méthode habituelle.

Nous avons utilisé quatre groupes de cinq souris femelles impubères qui reçoivent une boulette de foie par jour; les souris sont sacrifiées le deuxième jour, leurs utérus prélevés et pesés.

b) **Viande**

La viande des quatre poulets est désossée, passée séparément au hachoir et additionnée de farine (dans la proportion de trois parties de viande pour une partie de farine) afin de confectionner des biscuits séchés de sept grammes. Nous utilisons quatre groupes de dix souris femelles impubères qui sont alimentés avec les biscuits ainsi préparés. Les souris sont sacrifiées le deuxième jour, et leurs utérus prélevés et pesés.

c) Résultats

— Poids des utérus en milligrammes.

Tableau LXIV

Poulets provenant Elevage A...		Poulets provenant Elevage B...		Poulets provenant Elevage C ...		Poulets provenant Elevage D...	
Foies	Viandes	Foies	Viandes	Foies	Viandes	Foies	Viandes
10	13	38	14	9	08	08	12
10	12	42	11	11	11	12	08
14	13	31	12	9	10	10	14
09	10	22	12	10	15	10	9
10	9	24	13	11	9	08	10
	11		13		9		11
	10		24		10		13
	9		11		9		10
	8		14		11		11
	10		13		10		10
x 10,6	10,5	31	13,7	10	10,2	9,6	10,8

CONCLUSION

Cet essai nous démontre l'intérêt de notre méthode qui permet de déceler très rapidement toute volaille suspecte. On peut affirmer que les poulets provenant des élevages A, C, D ne possèdent aucun résidu œstrogénique ni dans leurs foies, ni dans leurs carcasses. Le poulet provenant de l'élevage B est suspect d'avoir reçu dans son alimentation des additions d'œstrogènes dans la proportion de 0,50 mg par kilogramme de denrée. A la suite de ces résultats, une enquête supplémentaire a été demandée, pour complément d'information et nouveaux prélèvements...

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

« Le décret n° 59-450 du 20 mars 1959 interdit la détention, en vue de la vente, la mise en vente ou la vente d'aliments additionnés de certaines substances chimiques ou biologiques et destinés à des animaux dont la chair ou les produits sont consommés par l'homme. Sont d'ores et déjà interdites la détention en vue de la vente, la mise en vente ou la vente d'aliments additionnés de substances arsenicales, antimoniales ou œstrogènes. Sont interdits en vue de la vente, la mise en vente, ou la vente, pour la consommation humaine, des animaux ou des denrées alimentaires en provenance d'animaux auxquels ont été administrés, par quelque procédé que ce soit, des substances arsenicales, antimoniales ou œstrogènes ».

Il est donc extrêmement important de pouvoir déceler rapidement la présence d'œstrogènes synthétiques ou naturels dans le produit livré à la consommation humaine.

Après avoir rappelé les recherches effectuées dans ce sens, et les doutes émis sur la possibilité d'employer une méthode biologique pour avoir un résultat rapide nous avons cherché à mettre au point une technique spécifique permettant de répondre à bref délai. Notre préférence a été donnée à l'épreuve d'Astwood fondée sur l'augmentation du poids de l'utérus de la souris femelle impubère.

Dans une première partie, nous avons étudié la sensibilité de cette réaction par alimentation des animaux avec le foie ou la viande de poulet. Les œstrogènes synthétiques (stilbœstrol et hexanœstrol) ont été ajoutés en quantités variables à la glande et au muscle et transformés en biscuits par addition de farine. Les biscuits séchés à l'étuve à 100° ont été administrés aux souris. Nous avons ainsi constaté :

— une addition de 5 µg d'œstrogènes synthétiques dans un

kilogramme de viande était facilement mise en évidence, en quarante-huit heures, par l'augmentation de poids de l'utérus de souris femelles impubères;

— pour les œstrogènes naturels, la sensibilité de la méthode était au moins de 10 μg d'œstrogènes dans un kilogramme de viandes.

Dans une deuxième partie, nous avons étudié l'action des « pellets » (« stilcoqvrac » composé d'œstrogènes synthétiques : stilbœstrol et hexanœstrol) insérés dans le derme du cou de jeunes poulets. Nous avons nourri des souris femelles impubères avec des biscuits composés de différentes parties du poulet traité, à savoir : le foie, la tête et la graisse du cou, et la viande désossée. Nous avons constaté que :

— les poulets ainsi traités renfermaient des résidus œstrogéniques dans une proportion supérieure à :

— 80 μg d'œstrogènes par kilogramme pour le foie, la tête et le cou;

— 30 μg d'œstrogènes par kilogramme pour la viande désossée.

Nous avons opéré de la même façon sur de jeunes poulets avec des « pellets » d'œstrogènes naturels (œstradiol et progestérone) et nous pouvons également affirmer qu'il existe dans les poulets ainsi traités des résidus œstrogéniques dans une proportion de :

— 25 μg d'œstrogènes/kilogramme pour le foie, la tête et le cou;

— 15 μg d'œstrogènes/kilogramme pour la viande désossée.

Donc, des poulets traités avec des comprimés d'œstrogènes synthétiques ou naturels sont très facilement décelables par notre méthode fondée sur l'épreuve d'Astwood.

Dans une troisième partie, nous avons étudié l'action de doses décroissantes d'œstrogènes synthétiques dans la nourriture des poulets. Les souris sont alimentées pendant quarante-huit heures avec des boulettes composées soit de foies, soit de viande désossée des poulets ainsi traités. La sensibilité de la méthode est au moins de 0,30 mg d'œstrogènes dans un kilogramme d'aliment pour poulets. A cette dose, les résultats sont beaucoup plus précis avec le foie (moyenne des poids d'utérus de souris : 27 mg) qu'avec la viande (moyenne des poids d'utérus de souris : 12,4 mg, ce qui correspond à un taux de 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ d'œstrogènes). Nous atteignons ici la limite de la sensibilité de la méthode et nous confirmons la concentration élective des œstrogènes de synthèse dans le foie.

Nous avons également étudié l'action des doses décroissantes d'œstrogènes naturels dans la nourriture des poulets. La sensibilité de la méthode est au moins de 1 mg par kilogramme d'aliment. Les doses de 50 mg et de 10 mg ne donnent pas des résultats beaucoup plus forts que ceux obtenus avec 1 mg, ce qui montre qu'une importante partie de l'œstradiol est détruite. Le foie fixe moins électivement l'œstrogène naturel que celui de synthèse.

En résumé, nous pouvons, à l'aide de l'épreuve d'Astwood fondée sur l'augmentation du poids de l'utérus de souris femelle impubère, mettre en évidence, en quarante-huit heures, dans le foie ou la viande de poulet, la présence d'œstrogènes synthétiques ou naturels administrés à la volaille soit par addition dans les aliments, soit par traitement chimique (Pellets).

Notre technique est actuellement adoptée par le laboratoire de toxicologie (Service de la Répression des fraudes) de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort.

Vu, le Doyen : *Vu, le Président :*

G. VALETTE. A. QUEVAUVILLER.

Vu, et permis d'imprimer,
Le Recteur de l'Académie de Paris :

ROCHE.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 ANDREWS et Coll. — *J. Ann. Sc.*, 1949, **8**, 578.
- 2 ASTWOOD (E.-B.). — *Endocrinology*, 1938, **23**, 25.
- 3 BERN (H.-A.). — *Am. Science*, 1960, **131**, 1 039.
- 4 BIRD, PRIGSLEY, KLEITZ. — The quantitative recovery of synthetic oestrogen. from tissues of Birds; *Endocrinology*, 1947, **41**, 282.
- 5 BUTENANDT (A.). — *Dtsch. med. Wschr.*, 1950, **5**.
- 6 COUSSENS (R.) et SIERENS (G.). — *Arch. int. Pharmacodyn.*, 1949, **78**, 309.
- 7 ENTEMANN et Coll. — *J. Biol. chem.*, 1940, **134**, 435.
- 8 FERRANDO (R.), BOISSELOT-LEFEBVRES (J.) et RATSIMAMANGA (A.-R.). — *C.R. Soc. Biol.*, 1960, **157**.
- 9 FERRANDO (R.) et RATSIMAMANGA (A.-R.). — *Journées Scientifiques du C.N. de coordination des études et recherches sur la nutrition et l'alimentation*; 26-29 octobre 1960.
- 10 GASSNER (F.-X.), MARTIN (R.-P.), ALGEO (W.-J.). — *Sympos. d. Dtsch Ges. f. Endokrinol.*, Kiel, avril 1959. Springer-Verlag Berlin Gottinger, Heidelberg, 1960.
- 11 GASSNER (F.-X.), REIFENSTEIN jr (E.-C.), ALGEO (W.-J.), MATTOX (W.), EARL. — *Rec. progr. hormone res.*, 1958, **14**, 183.
- 12 GRIFFITH et Coll. — *Nature*, 1941, **147**, 359.
- 13 HALAMA (A.-K.). — *Hormonale Rindermast*; *Wien Tierärztl. Mschr.*, 1959, **46**, 258.
- 14 HERRICK (E.-M.), PAULSON (C.), BARON (R.), BROWNING (C.-B.). — *J. Dairy Sc.*, 1959, **42**, 1966-1969.
- 15 HERTZ et Coll. — *Endocrinology*, 1949, **44**, 283.
- 16 HOPWOOD (M.-L.). — *Colo State Univ. Colo/U.S.A.*, Ph. D. Thesis, 1960.
- 17 KARG (H.). — Possibilités et limites de l'utilisation des substances hormonales actives sur l'engraissement des animaux domestiques; *Economie et Médecine Animales*, 1962, **3**, n° 5.
- 18 KOCH (W.). — *Berl. u. Münch. Tierärztl. Wochenst.*, 1950, **10**, 211.
- 19 KOCH et HEIM. — *Endokrinologie*, 1953, **30**, 335-338.
- 20 LACASSAGNE (H.). — *Schweiz. méd. Wschr.*, 1948, 705.
- 21 LETARD (E.) et SZUMOWSKI (P.). — *Compte rendu d'un colloque sur le mécanisme de la sécrétion lactée*; Strasbourg, 1950.

- 22 LETARD (E.), SZUMOWSKI (P.) et THERET (M.). — *Rec. Méd. Vét.*, 1952, **128**, 65-78.
- 23 LOESER et MARX. — *Hormonothérapie*, Liepzig, 1944.
- 24 LORENZ (F.-W.). — *Poultry Science*, 1943, **22**, 190.
- 25 LORENZ (F.-W.). — *Poultry Science*, 1945, **24**, 128.
- 26 LOUWERENS (B.). — Verslag. Mededel. Betreffende volksgesondheid; *Chim. Abstr.*, 1960, 207-209, **54**, **21**, 528.
- 27 MUHLBOCK (O.). — *Prog. in endocrinology II.*, Cambridge Univ. Press., 1961, **5**, 108.
- 28 QUEVAUVILLER (A.), BINET (P.). — Répercussion sur la santé humaine des adjuvants de l'alimentation animale; *Thérapie*, 1962, **17**, 775-793.
- 29 RATSIMAMANGA (A.-R.) et BOISSELOT-LEFEBVRES (J.). — Répercussion possible de la présence d'hormone dans le régime sur la physiologie de la nutrition; *Bull. Soc. Sc. Hygién. Alim.*, 1959, **47**, 137-145.
- 30 SCHAPER. — *Tierärztliche Umschau*, 1951, **7**, **8**, 124.
- 31 STAMLER et Coll. — *Endocrinology*, 1950, **46**, 381.
- 32 STOB (M.), ANDREWS (F.-N.), ZANROW (M.-X.) et BEESON (W.-X.). — Estrogenic activity of the meat of cattle sheep and poultry following treatment with synthetic estrogens and progesterone; *S. Anim. Sc. in Press*, 1954.
- 33 TRUHAUT (R.). — *Ann. Nutr. Alim.*, 1955, **9**, n° 1, **5**, 37.
- 34 WIBERG (G.-S.) and STEPHENSON (N.-R.). — The detection of estrogenic activity in tissues of steers; *Canadian J. of Biochim. and Physio.*, 1957, **35**, **1** 107.
- 35 WOLTERINK et Coll. — *Ann. J. Vet. Res.*, 1947, **8**, 431.

